



# Fractionnement isotopique du cuivre et du zinc lors de processus biogéochimiques dans les sols

Delphine Jouvin

## ► To cite this version:

Delphine Jouvin. Fractionnement isotopique du cuivre et du zinc lors de processus biogéochimiques dans les sols. Géochimie. Université Paris Diderot, 2009. Français. NNT : . tel-01282055

**HAL Id: tel-01282055**

**<https://hal.science/tel-01282055>**

Submitted on 3 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole doctorale des Sciences de la Terre

Doctorat

Géochimie Fondamentale et Appliquée

**Fractionnement isotopique du cuivre et du zinc lors de processus  
biogéochimiques dans les sols**

***Delphine Jouvin***

Thèse dirigée par Marc Benedetti et Pascale Louvat

Equipe de Géochimie des Eaux, Equipe de Géochimie & Cosmochimie

Soutenance le 25 mai 2009

Jury :

<b>Jérôme Viers</b>	Maitre de Conférences, Université Toulouse III	<b>Rapporteur</b>
<b>Dominik Weiss</b>	Senior Lecturer, Imperial College, London	<b>Rapporteur</b>
<b>François Guyot</b>	Professeur, Université Paris Diderot	<b>Examineur</b>
<b>Géraldine Sarret</b>	Chargé de Recherche, CNRS Grenoble	<b>Examineur</b>
<b>Marc Benedetti</b>	Professeur, Université Paris Diderot	<b>Co-directeur de thèse</b>
<b>Pascale Louvat</b>	Ingénieur de Recherche, CNRS Paris	<b>Co-directrice de thèse</b>



# Remerciements

A la fin de ce travail de thèse, je tiens à remercier de nombreuses personnes qui ont jalonné ma route.

Je tiens tout d'abord à remercier Marc Benedetti pour ces quatre ans et demi passés à travailler ensemble, depuis le stage de master jusqu'à cette fin de thèse. Je le remercie de m'avoir transmis une petite partie de sa grande connaissance du milieu naturel et de comment l'appréhender. Grâce à sa confiance, j'ai pu traverser de nombreux obstacles et j'ai pu apprendre à devenir une chercheuse autonome.

Merci aussi à Pascale Louvat qui a accepté de devenir ma co-directrice de thèse in extremis. Grâce à elle, j'ai entrepris un apprentissage plus rigoureux des méthodes isotopiques et du fonctionnement du Neptune. Sa rigueur et son attention m'ont aussi permis d'améliorer les divers manuscrits que j'ai eu à rédiger.

Merci à tous les deux pour votre soutien jusqu'au bout, le bout n'ayant pas été le plus facile.

Je voudrais remercier Jérôme Viers et Dominik Weiss d'avoir accepté de rapporter cette thèse avec autant d'enthousiasme et d'intérêt. François Guyot et Géraldine Sarret sont aussi remerciés pour avoir examiné ce travail et poser des questions pertinentes.

Je souhaite aussi exprimer ma reconnaissance envers Florian Ferec et Matthieu Bravin qui ont grandement participé aux expériences de croissance blé et tomate (encore merci pour le passage au phytotron le weekend Matthieu). Merci aussi à vous deux et à Philippe Hinsinger et Laurence Denaix pour tous ces échanges sur les plantes, domaine passionnant mais assez nouveau pour moi en début de thèse.

Chloé Maréchal et Farid Juillot m'ont aussi beaucoup apporté pour leurs discussions en géochimie et leur sympathie, qu'ils en soient remerciés.

Je voudrais aussi remercier toute l'équipe de Géochimie des Eaux pour son accueil et sa gentillesse. Une mention particulière à Monique Pèpe et Dominique Lavergne pour leur aide analytique, à Nadia Saraoui qui me réapprend régulièrement comment remplir les ordres de



mission et à Alexandre Gélabert et Yann Sivry, qui auraient dû arriver plus tôt au laboratoire. Merci à Alexis Groleau, Roselyne Ferrari, Didier Jezequel, François Prévot et Eric Viollier pour toutes les discussions en cafet et autres concours de gâteau.

Mes remerciements vont aussi à mon autre laboratoire (d'adoption ?) d'accueil qu'est le laboratoire de Géochimie & Cosmochimie. Je remercie vivement Pascale Louvat et Julien Moureau pour m'avoir régulièrement sauvé sur le Neptune, Jiu-Bin Chen pour son aide sur l'isotopie du zinc et les deux Jean-Louis pour leur aide sur la chimie et les colonnes. Merci aussi à Mickael Tharaud, Françoise Capmas, Ed Tipper, Manuel Moreira, Sylvie Cangemie et à tous les autres.

Je tiens aussi à remercier tous mes compagnons de route qui ont suivi ce même chemin difficile. Un souvenir ému pour les anciens habitants du bureau 513 à jussieu : Laura, Valérie, Marie, Edouard (pause goûter ?) et pour la nouvelle génération : Noémie, Lucie, Emily et Florian (soirée cocktail ou fondue ?). Merci à Guillaume, mon colocataire de bureau, pour sa capacité à me supporter et son grain de folie communicatif et à Sandrine pour toutes ces conversations sur le sens de la vie et le chocolat. Une pensée aussi à Julien, Benjamin B., Benjamin C., Sophie, Eozen, Antoine, Lorraine avec qui j'ai passé tant de bonnes soirées et partagé un certain nombre de gâteaux au chocolat.

Merci à aussi à mes amis « extérieurs » qui m'ont permis de voir autre chose que la thèse. En particulier merci au groupe du théâtre du lundi soir Rachel, Rémi, Lucie, Laure, Véro, Stéphanie pour le défoulement garanti. Merci aussi à Sean et Marion qui ont été là depuis le début et à la bande des magistériens de la première heure, Lucille, Shasa, Nadaya and co.

Mes parents ainsi que mes deux sœurs ont aussi été d'un grand secours dans les moments difficiles et je leur en suis très reconnaissante. Last but not least, une pensée à mes grands-parents qui ont toujours cru en moi et qui, malheureusement, n'ont pas tous pu suivre ce travail jusqu'au bout.

# Sommaire

<b>Introduction Générale</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre I</b>	<b>15</b>
<b>1. Biogéochimie du cuivre et du zinc</b>	<b>17</b>
1.1. Atmosphère	17
1.2. Rivières	18
1.3. Océan	19
1.4. Sols	20
1.5. Biosphère	20
<b>2. Chimie du cuivre et du zinc – Spéciation et processus</b>	<b>22</b>
2.1. Propriétés atomiques	22
2.2. Spéciation en milieu aqueux	23
2.3. Mesures de spéciation	31
<b>3. Cycle anthropique</b>	<b>34</b>
3.1. Historique	34
3.2. Minerais	35
3.3. Propriétés physico-chimiques et utilisation par l'homme	36
3.4. Sols contaminés	37
<b>4. Géochimie isotopique</b>	<b>41</b>
4.1. Cuivre	42
4.2. Zinc	51
<b>5. Objectifs de l'étude</b>	<b>55</b>
<b>Chapitre II</b>	<b>69</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>71</b>
<b>2. Montage Expérimental</b>	<b>71</b>
2.1. Donnan Membrane	71
2.2. Plantes	77
<b>3. Mesures de concentration</b>	<b>78</b>
3.1. Spectrométrie d'Absorption Atomique Flamme	78
3.2. Dosage de carbone organique (Total Organic Carbon Analyser)	78
3.3. Spectrométrie de masse pour la mesure de concentrations en éléments traces	79

<b>4. Mesure des rapports isotopiques du cuivre et du zinc</b>	<b>80</b>
4.1. Purification chimique	80
4.2. Mesure des rapports isotopiques sur le MC-ICP-MS (Neptune)	84
4.3. Correction de discrimination de masse ?	86
4.4. Quel standard utiliser ?	95
4.5. Comparaison des différentes méthodes de correction de la discrimination de masse	96
4.6. Influence du système d'introduction	102
4.7. Effets de matrice	108
4.8. Modification de la matrice par dopage	111
4.9. Evolution des standards sur 3 ans	112
<b>5. Modélisation</b>	<b>114</b>
5.1. Le modèle électrostatique de Donnan	114
5.2. Modèle NICA	115
5.3. FLUXY	117
<b>Chapitre III</b>	<b>123</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>129</b>
<b>2. Materials and methods</b>	<b>130</b>
2.1. Materials	130
2.2. Donnan Membrane	130
2.3 Methodology	131
2.4. MC-ICP-MS Zn isotopic analysis	132
2.5. NICA-Donnan modeling	133
<b>3. Results</b>	<b>134</b>
3.1. Membrane experiments	134
3.2. Donnan Membrane device validation	134
3.3. Zn adsorption and isotopic fractionation as a function of pH	135
<b>4. Discussion</b>	<b>137</b>
4.1. Determination of the isotopic composition of Zn complexed to PHA	137
4.2. Chemical speciation and site-specific isotopic fractionation factors	138
4.3. From bond strength and adsorption constants to isotopic fractionation	140
4.4. Influence of OM on the isotopic signature of free $Zn^{2+}$ ions of the Seine River	141
4.5. Limitations and Applications of the DM device	143
<b>Supporting information</b>	<b>149</b>
1. Equilibrium time of the Donnan Membrane device	150

2. MC-ICP-MS instrumental mass bias correction	151
3. Membrane alone experiments	154
4. Specific isotopic fractionation factors for the low and high affinity sites of the Purified Humic Acid	155
5. Updating generic Zn binding parameters for fulvic acid (FA)	156
<b>Chapitre IV</b>	<b>159</b>
1. Introduction	165
2. Materials and methods	167
2.1. Plant growth	167
2.2. Sample preparation	168
2.3. Isotopic measurements	169
2.4. Flux uptake modelling	169
3. Results	171
3.1. Biomass and Concentration	171
3. Isotopic compositions	173
4. Discussion	176
4.1. Possible effects of blanks and seed reserves on Zn and Cu isotopic fractionations	176
4.2. Nutrient Solution-Root interface processes	177
4.3. Translocation (transfer from roots to shoots)	181
Conclusion	183
<b>Chapitre V</b>	<b>196</b>
1. Introduction	202
2. Materials and methods	203
2.1. Soils sampling and analysis	203
2.2. Plant growth	204
2.3. Isotopic measurements	205
2.4. Speciation in the soil solution	206
2.5. Modeling	207
3. Results	208
3.1. Soils	208
3.2. Plants	209
3.4. Rhizon and SC-DM	210
3.5. Modeling soils and soil solutions	212

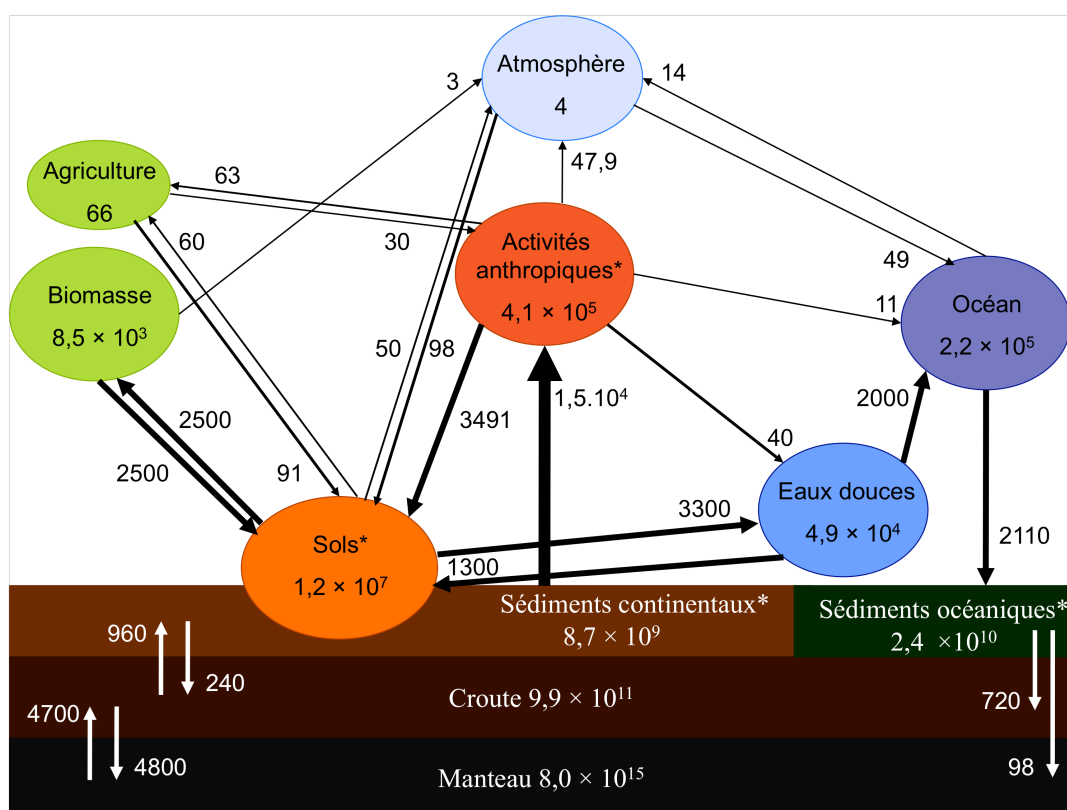
3.6. Cu isotopic measurements	215
<b>4. Discussion</b>	<b>217</b>
4.1. Plant uptake and bioavailability	217
4.2. Modeling and organic matter reactivity	219
4.3. Cu isotopic fractionation in soils and plants	221
<b>5. Conclusion</b>	<b>224</b>
<b>Conclusion</b>	<b>234</b>

# **Introduction Générale**



## Introduction Générale - Un cycle biogéochimique fortement perturbé

Les cycles biogéochimiques du cuivre et du zinc sont fortement influencés par les activités anthropiques. Dans le cas du cuivre, comme on peut le voir dans la Figure 1, les activités anthropiques sont à l'origine de flux supérieurs ou de même ordre de grandeur que les flux naturels et le « réservoir » anthropique contient plus de cuivre que les eaux douces ou la biomasse.

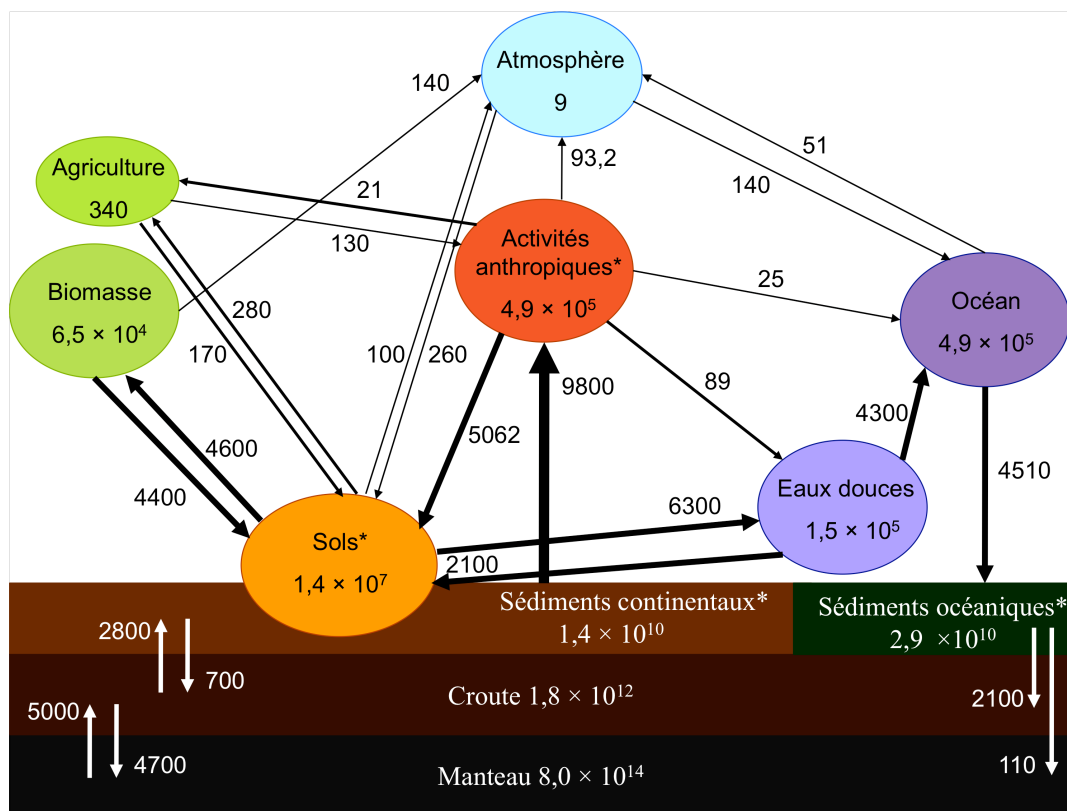


**Figure 1:** Cycle du cuivre d'après Rauch and Pacyna.<sup>1</sup> représentant les flux (en Gg de cuivre par an) et les réservoirs de cuivre (en Gg de cuivre) dans le milieu des années 2000. Les réservoirs avec une astérisque ne sont pas à l'équilibre comme par exemple celui des activités anthropiques.

Pour le zinc, même si la connaissance des différents réservoirs est moins complète (voir Figure 2), les flux de sortie du « réservoir » anthropique sont aussi de même ordre de grandeur que d'autres flux naturels comme le flux entre eaux douces continentales et océans. Les plus gros rejets, de cuivre comme de zinc, ont lieu vers les sols puis vers les eaux douces.



Au niveau des sols, les apports en cuivre et en zinc peuvent avoir lieu via des retombées atmosphériques, via des apports directs aux sols (amendements organiques, boues industrielles ou agricoles, produits phytosanitaires, rejets de fonderies,...) et des apports indirects (chutes de végétaux contaminés). Ces rejets dans l'environnement peuvent provoquer de nombreux cas de pollution importante, par accumulation de ces métaux, en particulier dans les sols et les sédiments et éventuellement, diffusion vers la biomasse ou d'autres réservoirs. Le sol et les rivières sont des réservoirs clés pour la diffusion des métaux dans l'environnement car ils sont au centre des échanges dans le cycle externe de ces métaux et sont par ailleurs à la base de la chaîne alimentaire.



**Figure 2 :** Cycle du zinc actuel d'après Rauch and Pacyna.<sup>1</sup> représentant les flux (en Gg de zinc par an) et les réservoirs de zinc (en Gg de zinc) dans le milieu des années 2000. Les données présentées ici ont été rassemblées dans la thèse de J. Chen<sup>2</sup> (Albarède et al.<sup>3</sup>, Allègre et al.<sup>4</sup>, Gaillardet et al.<sup>5, 6</sup>, Lohan et al.<sup>7</sup>, Nriagu.<sup>8</sup>, Nriagu et Pacyna.<sup>9</sup>, McDonough et al.<sup>10</sup>, Witt-Eickschen et al.<sup>11</sup>).

Le cuivre et le zinc sont des oligo-éléments, c'est-à-dire qu'ils sont indispensables à la vie des êtres vivants. Le cuivre est beaucoup utilisé pour ses propriétés d'oxydo-réduction par les plantes<sup>12</sup>. Il est présent dans de nombreuses enzymes intervenant dans des processus physiologiques tel que la photosynthèse et la respiration. Il entre aussi dans la formation des

parois cellulaires. Le zinc est un élément important pour le métabolisme des protéines et des acides nucléiques et il est essentiel pour la synthèse de l'ADN et de l'ARN<sup>13, 14</sup>. Une déficience en ces éléments peut donc avoir des conséquences sur la régulation des activités enzymatiques et métaboliques des êtres vivants.

Cependant, la présence de ces éléments en trop grande concentration dans l'environnement, par une pollution anthropique ou une anomalie géochimique naturelle, peut provoquer une toxicité importante pour les êtres vivants. Une concentration trop élevée n'est pas seule responsable de la toxicité éventuelle de ces éléments mais la forme chimique sous laquelle sont ces éléments, c'est à dire sa spéciation, influence aussi leur mobilité dans l'environnement et leur biodisponibilité. La biodisponibilité d'un élément dépend de sa fraction chimiquement disponible, des capacités de l'organisme à le prélever et de son effet toxique<sup>12</sup>. Les deux premiers facteurs de la biodisponibilité sont donc fonction de la spéciation de l'élément dans le milieu considéré. Celle-ci dépend de nombreux paramètres comme le pH, la force ionique, la composition du sol (oxydes de fer, argiles, matière organique), la présence d'organismes vivants... Dans ce contexte, il est donc fondamental de bien comprendre le cycle biogéochimique du cuivre et du zinc, aussi bien à l'échelle globale – quelles sont les sources et les puits de ces éléments – qu'à l'échelle des mécanismes – quels sont les processus qui influencent leur spéciation.

En ce sens, les premiers résultats de mesures isotopiques des métaux, comme le fer, dans l'environnement désignent l'outil isotopique comme un traceur de choix des sources et processus. En effet, il est possible de caractériser à l'échelle locale les sources de pollution anthropique grâce aux mesures des compositions isotopiques des différents compartiments et de suivre l'évolution spatiale de cette contamination. Pour une interprétation complète de ces mesures dans l'environnement, il est cependant crucial de connaître les changements de signature isotopique associés aux différents processus que pourra subir un élément (oxydo-réduction, adsorption sur des surfaces, complexation, absorption par des organismes). La caractérisation isotopique des grands réservoirs terrestres ainsi que des principaux processus n'en est, pour le cuivre et le zinc, encore qu'à ses débuts.

De par la complexité du système organique et à sa diversité, alors même qu'il présente une importance cruciale dans le devenir des métaux dans l'environnement, les signatures isotopiques de ses principaux composants et des processus associés sont encore plus mal connues. En effet, le vivant se caractérise par une variabilité nécessitant la réalisation de

nombreuses mesures et expérimentations pour chaque détermination de paramètres. Même pour les organismes d'intérêt général, comme le blé, le riz, le maïs,... les mécanismes de prélèvement des métaux sont mal connus. Les produits de décomposition du vivant, i.e. la matière organique, sont chimiquement très réactifs, mais restent difficile à appréhender expérimentalement. En conséquence, la caractérisation isotopique des réactions des métaux avec la matière organique se trouve confrontée à la variabilité naturelle et aux limites de précision de la mesure isotopique.

Ce travail de thèse a donc été réalisé dans l'objectif de mieux caractériser à l'aide de l'outil isotopique le fractionnement isotopique du zinc lors de sa complexation avec un acide humique, le prélèvement du cuivre et du zinc par les plantes en hydroponie et le prélèvement du cuivre par les plantes cultivées sur des sols contaminés en cuivre. Plusieurs approches ont été utilisés à cet effet : une approche expérimentale a été mise en œuvre afin de séparer différents « réservoirs » de cuivre et de zinc : zinc libre et zinc complexé par l'acide humique, cuivre et zinc dans la/le solution/sol et cuivre et zinc dans les plantes (racines et parties aériennes) et une approche modélisation nous a permis de mieux appréhender les mécanismes responsables des fractionnements mesurés.

# **Chapitre I**

## **Géochimie du Cuivre et du Zinc**



# Chapitre I

## Géochimie du Cuivre et du Zinc

Ce chapitre introductif présente l'état des connaissances sur les grands cycles biogéochimiques du cuivre et du zinc, leurs teneurs dans les différents réservoirs terrestres, leurs propriétés chimiques (spéciation et processus) en solution et dans les végétaux, mais aussi sur les utilisations et rejets anthropiques de ces métaux et sur les études isotopiques existantes. Mettant en évidence certains manques, les objectifs de ce travail de thèse sont décrits comme autant de tentatives d'y remédier.

### 1. Biogéochimie du cuivre et du zinc

Allègre et al.<sup>4</sup> ont déterminé la concentration moyenne pour la terre dans son ensemble des différents éléments et en particulier pour le cuivre et le zinc avec des concentrations de  $64,7 \pm 5$  ppm pour le cuivre et de  $24 \pm 2$  ppm pour le zinc. Pour le manteau, les concentrations obtenues sont de 25 ppm pour le cuivre<sup>1</sup> et de 55 ppm pour le zinc<sup>10</sup>. Dans la croûte, elles sont de 24 ppm pour le cuivre et de 73 ppm pour le zinc<sup>15</sup>.

Les sédiments ont des concentrations en cuivre relativement contrastées allant de  $75 \pm 16$  ppm pour les sédiments océaniques<sup>16</sup> et de 40 ppm pour les sédiments terrestres<sup>1</sup>. En revanche, pour le zinc, les concentrations sont plus uniformes :  $86 \pm 9$  ppm pour les sédiments océaniques<sup>16</sup> et 80 ppm pour les sédiments terrestres<sup>8</sup>.

Les concentrations en cuivre et en zinc des principaux réservoirs de la surface terrestre sont détaillées dans les paragraphes suivants.

#### 1.1. Atmosphère

Les émissions naturelles en cuivre dans les conditions interglaciaires actuelles sont de 2800 tonnes par an<sup>17</sup> et sont principalement le fait des émissions volcaniques, du transport par le

vent de poussières provenant de l'érosion et des feux de forêt. Les rejets anthropiques de cuivre dans l'atmosphère ont été estimés environ à 0,3 tonnes par an autour de 500 avant J.C. et à 2,3 tonnes par an en 1850<sup>18</sup>. Actuellement, les émissions anthropiques sont de l'ordre de 22500 tonnes par an<sup>18</sup>, ce qui est très largement supérieur aux émissions naturelles. La spéciation du cuivre dans l'atmosphère n'est pas bien connue et dépend beaucoup des sources, les sources anthropiques produisant principalement du cuivre sous forme d'oxydes dans l'atmosphère<sup>18</sup>.

Le flux de zinc vers l'atmosphère de sources naturelles est estimé à 43700 tonnes par an<sup>8</sup>, dont 60 % de poussières emportées par le vent, 20 % du fait de la végétation, 15 % de feux de forêt et 5 % des activités volcaniques. Les activités anthropiques sont responsables de l'émission de 315000 tonnes de zinc par an, c'est à dire d'environ 90 % du total des émissions de zinc vers l'atmosphère. Ces flux sont un ordre de grandeur supérieurs à ceux du cuivre.

Lors d'une étude sur des sols en Norvège, Steinnes et al.<sup>19</sup> ont remarqué que le transport atmosphérique du zinc s'effectuait sur de longues distances alors que pour le cuivre, il ne s'étendait pas au-delà de 100 km.

Les concentrations moyennes en cuivre et en zinc dans les pluies de diverses locations en Europe pendant les années 1995-1996 ont été recensées par Deboudt et al.<sup>20</sup>. En cuivre, elles sont comprises entre 0,09 et 3,2 ppb et en zinc, entre 3 et 360 ppb. Cependant des valeurs beaucoup plus élevées peuvent être enregistrées dans des zones fortement industrialisées. Ainsi, Nguyen et al.<sup>21</sup> ont mesuré jusqu'à 90 ppb de cuivre et 1,3 ppm de zinc à proximité de sites industriels. Ces concentrations en zinc peuvent sembler élevées, néanmoins, Chen et al.<sup>22</sup>, qui ont effectué des mesures de pluie à Paris, ont aussi obtenu des valeurs très importantes en zinc (de 11 à 115 ppm).

## 1.2. Rivières

Gaillardet et al.<sup>6</sup> ont étudié la géochimie de la phase dissoute des plus grands fleuves mondiaux. Pour le cuivre, les concentrations sont comprises entre 0,5 et 3,5 ppb (la Seine, France, est la plus contaminée) avec une moyenne de 1,5 ppb ( $n = 37$ ). Ceci correspond à un flux à l'océan de cuivre dissous de  $55 \text{ kt.an}^{-1}$ . Pour le zinc, les concentrations sont comprises entre 0,05 et 27,0 ppb (La Volga étant le fleuve le plus contaminé) avec une moyenne de 0,6 ppb ( $n = 35$ ), correspondant à un flux de  $23 \text{ kt.an}^{-1}$ .

Dans la phase particulaire, i.e. les particules en suspension dans les rivières, la concentration, aussi bien en cuivre qu'en zinc, est beaucoup plus élevée. Elle est évaluée entre 20 (peu pollué) et 100 ppm (Hong Da, Chine, 94 ppm) pour le cuivre et entre 70 (peu pollué) et 200 ppm (St Laurent, Canada, 247 ppm) pour le zinc<sup>5</sup>.

L'estuaire de l'Escaut aux Pays-Bas a été étudié par Zwolsman et al.<sup>23, 24</sup> aussi bien pour les métaux dans la phase dissoute que dans la phase particulaire. Dans la phase dissoute, les concentrations en cuivre et en zinc sont faibles, de 0,1 à 2 ppb pour le cuivre et de 0,1 à 20 ppb pour le zinc. Les concentrations sont les plus faibles au printemps et à l'été et plus élevées pendant l'hiver. Dans la phase particulaire, comme pour les rivières, les concentrations sont beaucoup plus élevées, avec des valeurs comprises entre 16 et 288 ppm pour le cuivre et entre 128 et 1196 ppm pour le zinc. Les concentrations en cuivre et en zinc dans la phase dissoute augmentent puis diminuent suivant la salinité alors que celles dans la phase particulaire ne font que diminuer.

Dans l'estuaire de la Tamise, Stevenson et al.<sup>25</sup> mesurent des concentrations légèrement supérieures en phase dissoute, avec des concentrations comprises entre 1,7 et 7,6 ppb pour le cuivre et entre 6,7 et 32,5 ppb pour le zinc. Dans les sédiments, les concentrations sont entre 15,2 et 70 ppm en cuivre et entre 72,8 et 244 ppm en zinc. Les estuaires, dont les concentrations en métaux ont été mesurées, sont des estuaires très impactés par les activités anthropiques, comme en témoignent les fortes concentrations dans la phase dissoute.

Mais chaque fleuve, chaque bassin versant peut avoir une histoire différente à raconter, les sources des métaux n'étant pas toujours les mêmes.

### 1.3. Océan

Les concentrations en cuivre et en zinc dans l'océan sont très faibles. Ainsi, dans l'Atlantique Nord, Saager et al.<sup>26</sup> ont mesuré des concentrations en cuivre entre 0,08 et 0,16 ppb dans les eaux profondes. Dans la Mer du Nord, qui est globalement assez polluée, la concentration moyenne sur les premiers 60 mètres est de 0,10 ppb pour le cuivre et de 0,29 ppb pour le zinc<sup>27</sup>. De plus, Lohan et al.<sup>7</sup> ont mesuré dans le nord-est du Pacifique des concentrations en zinc pour les eaux de surface comprises entre 0,003 ppb et 0,04 ppb et pour les eaux profondes entre 0,12 et 0,14 ppb.



#### 1.4. Sols

Davies & Benett<sup>28</sup> obtiennent une gamme de valeurs entre 2 et 250 ppm pour les sols, avec une concentration médiane de 30 ppm. Dans les sols français non contaminés, la concentration en cuivre est estimée entre 2 et 20 ppm<sup>29</sup>. Le cuivre présente une grande affinité pour la matière organique et les particules les plus fines du sol.

Le cuivre soluble est en général présent en petite quantité dans les sols, en général moins de 1 à 2 %<sup>30</sup>. Dans la solution du sol, la proportion de cuivre libre  $\text{Cu}^{2+}$  est très variable. Par exemple, Weng et al.<sup>31</sup> ont mesuré des proportions de cuivre libre entre 2 et 76 % pour des pH variant entre 3,8 et 6,1, les proportions les plus faibles de cuivre libre en solution étant observées pour les pH les plus élevés. De même, Vulkan et al.<sup>32</sup> ont déterminé des proportions de  $\text{Cu}^{2+}$  de 0,02 à 96 % dans 22 solutions de sol, et pour les pH supérieurs à 6, elles étaient toutes inférieures à 1 %.

Nriagu<sup>8</sup> a estimé la teneur en zinc des sols non contaminés entre 10 et 300 ppm. Pour les sols français, cette gamme se trouve entre 10 et 100 ppm<sup>29</sup>. Des sols de la Réunion ont été mesurés par Doelsch et al.<sup>33</sup> avec une concentration moyenne en zinc de 146,1 ppm. En général, la concentration en zinc dans les sols est plus faible que dans les roches mères et, comme le cuivre, le zinc sera enrichi dans les fractions les plus fines.

Dans la solution interstitielle du sol, les métaux se trouvent à des concentrations plus faibles que dans les sols. Ainsi, Weng et al.<sup>34</sup> ont déterminé la concentration en métaux dans les solutions de sols et la proportion de métaux dissous de 15 sols aux Pays-Bas. Les concentrations en zinc dans les sols varient de 6,3 à 462,5 ppm et dans les solutions du sol de 0,02 à 2,8 ppm. Dans ces solutions du sol, la proportion de  $\text{Zn}^{2+}$  va de 47 à 99 %.

#### 1.5. Biosphère

Le cuivre et le zinc sont des oligo-éléments, ce qui signifie qu'ils sont indispensables aux êtres vivants. On les trouve donc en quantité non négligeable dans la biomasse. Les algues ont des concentrations comprises entre 6 et 20 ppm pour le cuivre<sup>35</sup> et entre 27 et 63 ppm pour le zinc<sup>35, 36</sup>. Les crustacés contiennent entre 0.5 et 13 ppm de cuivre<sup>35, 37</sup> et entre 8 et 85 ppm de zinc<sup>35-37</sup>. Les poissons ont des concentrations en moyenne plus élevées avec des valeurs

comprises entre 0.5 et 51 ppm pour le cuivre<sup>38</sup> et entre 3.5 et 100 ppm de zinc<sup>36, 38</sup>. Chez les êtres humains, la concentration en cuivre est estimée entre 1 et 1.7 ppm<sup>18, 39</sup>.

Pour les mammifères<sup>39</sup>, les déficiences en cuivre sont rares mais sont synonymes de perte de poids, d'anémie, de mauvais fonctionnement du système nerveux central. La déficience en zinc pour les mammifères conduit à une baisse du système immunitaire, un mauvais fonctionnement du système génital masculin, des problèmes de développement dans le cas des fœtus et des enfants pouvant aller jusqu'à des malformations, un arrêt de la croissance, et peut même être fatal<sup>13</sup>. Les mammifères sont peu sensibles à la toxicité du cuivre mais lors des contaminations extrêmes, ils seront affectés par une anémie, suivie d'une dégénérescence du foie, des reins et du cerveau<sup>39</sup>. Le zinc n'est pas très toxique pour les mammifères mais est responsable de problèmes multiples à doses élevées (80-90 ppm chez l'être humain)<sup>13</sup> : hépatique, immunologique, rénal, gastro-entérologique, cardiovasculaire,...

Si l'on se focalise sur le règne végétal, les lichens présentent une gamme de concentrations en cuivre et en zinc étendue de par leur capacité à accumuler les métaux. En Finlande, la mousse et les lichens ont une concentration en cuivre autour de 6 ppm<sup>40</sup> alors qu'à Singapour, les concentrations atteignent des valeurs proches de 50 ppm<sup>41</sup>. Dans l'antarctique, des lichens contiennent autour de 6 ppm en zinc<sup>36</sup> alors que dans les régions industrialisées, leur concentration en zinc peut monter jusqu'à plusieurs centaines de ppm<sup>42</sup>. Différentes herbacées présentent des concentrations en cuivre entre 6.5 et 11.5 ppm en Russie<sup>43</sup> et en zinc entre 20 et 45 ppm en Pologne (herbe, pissenlit, avoine)<sup>44</sup>. Les arbres ont des concentrations variables en fonction des espèces. Comme pour les autres plantes et êtres vivants, le cuivre est présent en concentrations plus faibles que le zinc. Ainsi dans des pins en Californie, Kirchner et al.<sup>45</sup> mesurent une gamme de concentrations de 0,1 à 49 ppm en cuivre et de 0,7 à 82 ppm en zinc. De même, dans des épicéas en Norvège, Andersen et al.<sup>46</sup> mesurent de 0.8 à 9.6 ppm pour le cuivre contre 10.9 à 41.7 ppm pour le zinc.

Une déficience en cuivre dans les plantes provoque des nécroses et déformations des feuilles, la mort des tiges latérales et une réduction importante de la lignification<sup>47</sup>. Une déficience en zinc engendre une baisse de croissance importante des plantes pouvant aller jusqu'à la mort des organismes<sup>48</sup>.

En revanche, la phytotoxicité du cuivre concerne surtout les racines<sup>49</sup> car il s'accumule surtout dans les racines, et particulièrement dans l'apoplasme racinaire. Cela va entraîner un épaississement des racines et une diminution globale de l'élongation racinaire, ce qui va

affecter la perméabilité membranaire et provoque une perte d'ions et de solutés. Le cuivre peut aussi entrer en compétition avec le fer ce qui entraîne la mise en place d'une déficience en fer<sup>50</sup>. La phytotoxicité du zinc provoque une baisse de la croissance et une diminution du nombre de feuilles. Le zinc sera présent surtout dans les racines même s'il est plus accumulé dans les parties aériennes que d'autres métaux comme le cuivre ou le plomb<sup>51</sup>. La phytotoxicité du zinc engendrera des perturbations du système enzymatique, de la respiration et de la photosynthèse pouvant aller jusqu'à la mort des plantes.

## 2. Chimie du cuivre et du zinc – Spéciation et processus

### 2.1. Propriétés atomiques

De masse atomique 63,546, le cuivre possède 2 isotopes stables : <sup>63</sup>Cu et <sup>65</sup>Cu. Le zinc, de masse atomique 65,409, possède cinq isotopes stables : <sup>64</sup>Zn, <sup>66</sup>Zn, <sup>67</sup>Zn, <sup>68</sup>Zn et <sup>70</sup>Zn. Leurs abondances naturelles se trouvent dans le Tableau 1. Le numéro atomique du cuivre est de 29 ce qui correspond à une configuration électronique [Ar]3d<sup>10</sup>4s<sup>1</sup>. Pour le zinc, son numéro atomique est de 30 et sa configuration électronique [Ar]3d<sup>10</sup>4s<sup>2</sup>. En conséquence, le cuivre aura trois états d'oxydation possibles : Cu(0), Cu(I) et Cu(II) et le zinc seulement deux états d'oxydation possibles : Zn(0) et Zn(II). La première énergie d'ionisation (passage de M<sup>0</sup> à M<sup>+</sup>) est de 745,5 kJ/mol pour le cuivre et de 906,4 kJ/mol pour le zinc. L'énergie de deuxième ionisation (passage de M<sup>+</sup> à M<sup>2+</sup>) est de 1957,9 kJ/mol pour le cuivre et de 1733,3 kJ/mol pour le zinc.

masse	63	64	65	66	67	68	70
Cu	69,15		30,85				
Zn		48,27		27,98	4,10	19,02	0,63

**Tableau 1:** Abondance naturelle des isotopes du cuivre et du zinc <sup>52</sup> (%)

## 2.2. Spéciation en milieu aqueux

En milieu aqueux (solution du sol, rivière, lac,...), la spéciation d'un élément (i.e. sa forme chimique) influence son transport, sa biodisponibilité et plus généralement son devenir dans l'environnement. La toxicité d'un élément dépendra ainsi plus de sa spéciation que de sa concentration <sup>6</sup>. Par la suite, les principaux processus modifiant la spéciation d'un élément sont présentés : complexation inorganique et organique, adsorption sur les surfaces, précipitation et oxydoréduction. La complexation avec la matière organique et le prélèvement par les plantes feront l'objet d'un développement supplémentaire.

### 2.2.1. Complexation inorganique

Les cations métalliques peuvent être classifiés en fonction de leur capacité à former des liaisons covalentes. Les cations « durs » formeront principalement des liaisons électrostatiques avec les ligands alors que les cations « mous » formeront principalement des liaisons covalentes. Les cations sont des acides de Lewis, c'est à dire des accepteurs d'électrons tandis que les ligands complexants ces cations sont des bases de Lewis, c'est à dire des donneurs d'électrons. Les cations « durs » comme  $\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  se lieront principalement avec des bases « dures » comme  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,... Les cations « mous » comme  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  formeront principalement des complexes avec des ligands intermédiaires comme  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,... ou « mous » comme  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{HS}^-$ .  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  ont un caractère intermédiaire, existant aussi bien sous leur forme libre que sous forme de complexes hydroxyles ou avec les carbonates. Les concentrations des principaux ligands présents dans les eaux douces et dans l'eau de mer sont présentés dans le Tableau 2.

En solution aqueuse, le cuivre et le zinc sont entourés de 6 molécules d'eau, qui constituent leur sphère d'hydratation, sous la forme  $\text{Zn}(\text{OH})_6^{2+}$ . La déprotonation des molécules d'eau de la sphère d'hydratation amène à la formation de complexes avec les ions  $(\text{OH})^-$ , le cuivre et le zinc se comportent ici comme des acides faibles. La formation de ces complexes est donc fonction du pH et la majorité des cations sont présents sous forme d'oxy- et d'hydroxy-complexes aux pHs des eaux naturelles.

Domaines de concentration dans les eaux douces et l'eau de mer (log C[mol.L <sup>-1</sup> ])		
	Eaux douces	Eau de mer
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-4 à -2.3	-2.6
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-6 à -4	-4.5
Cl <sup>-</sup>	-5 à -3	-0.26
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-5 à -3	-1.55
F <sup>-</sup>	-6 à -4	-4.2
HS <sup>-</sup> /S <sup>2-</sup>	-6 à -3	-

**Tableau 2:** Concentrations des principaux ligands inorganiques dans les eaux naturelles <sup>53</sup>

La complexation avec les ligands inorganiques peut être décrite à l'aide de constantes de complexation. Un ion métallique M et un ligand L peuvent former des complexes du type ML<sub>1</sub>, ML<sub>2</sub>, ... ML<sub>n</sub> avec des constantes de complexation définies comme:

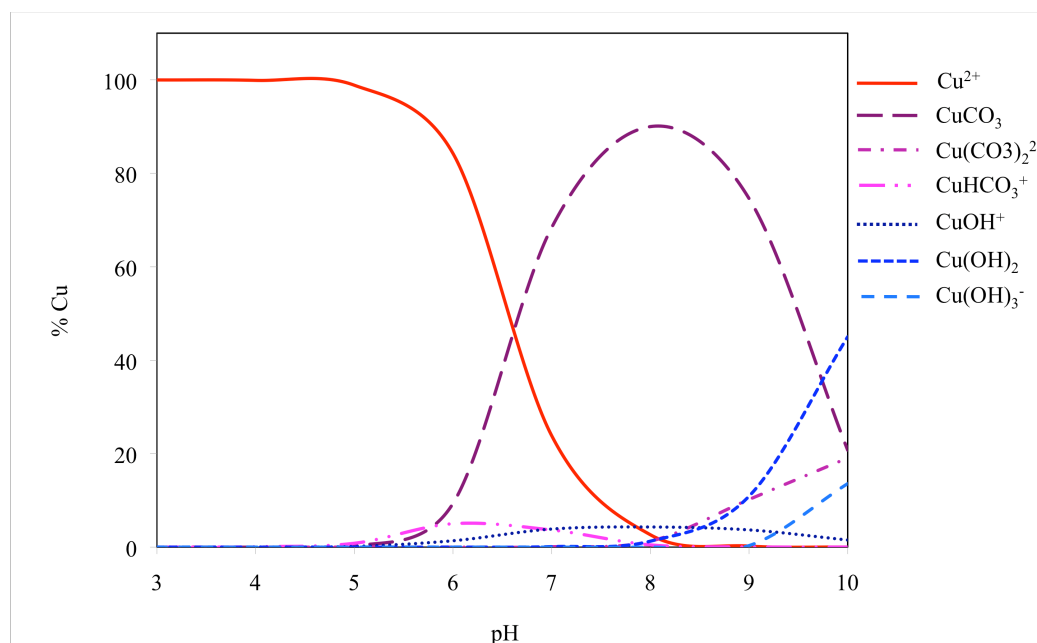
$$\beta_i = \frac{[ML_i]}{[M][L]^i}$$

avec i le nombre de ligands L complexés au métal M, [M] la concentration en métal M, [L] la concentration en ligand, [ML<sub>i</sub>] la concentration de métal complexé avec le ligand et  $\beta_i$  la constante de complexation. En solution, les ligands peuvent être protonés et plusieurs métaux et ligands peuvent être en compétition. Des exemples de constantes de complexation de Cu<sup>2+</sup> et de Zn<sup>2+</sup> avec les principaux ligands inorganiques sont présentés dans le Tableau 3.

	Cu <sup>2+</sup>	$\beta$	Zn <sup>2+</sup>	$\beta$
OH <sup>-</sup>	CuOH	6.0	ZnOH	5.0
	Cu(OH) <sub>2</sub>	11.8	Zn(OH) <sub>2</sub>	11.1
	Cu(OH) <sub>3</sub>	15.2	Zn(OH) <sub>3</sub>	13.6
	Cu(OH) <sub>4</sub>	16.4	Zn(OH) <sub>4</sub>	14.8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			ZnL	2.2
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CuL	6.7	ZnL	4.8
	CuL <sub>2</sub>	10.2		
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CuL	2.4	ZnL	2.1
			ZnL <sub>2</sub>	3.1
Cl <sup>-</sup>	CuL	0.5	ZnL	0.4
			ZnL <sub>2</sub>	0.6
			ZnL <sub>3</sub>	0.5

**Tableau 3 :** Constantes de complexation des complexes du cuivre et du zinc des principaux ligands présents dans l'environnement en log  $\beta$  (force ionique = 0 et à 25°C). D'après Morel et Hering<sup>54</sup> et repris par Sigg et al.<sup>53</sup>.

La formation de ces différents complexes dépend du pH, de la concentration en ligands, de la présence d'autres cations compétiteurs, ... Quand intervient un grand nombre d'espèces, il est nécessaire d'utiliser des codes de calculs pour déterminer la spéciation des métaux dans les milieux considérés.



**Figure 3:** Spéciation du cuivre en fonction du pH en présence des ligands  $\text{OH}^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  ( $\text{Cu}_{\text{Total}} 5 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$  et  $\text{C}_{\text{Total}} 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) (de Sigg et al.<sup>53</sup>)

### 2.2.2. Complexation organique

Sur le même principe, les ions métalliques peuvent former des complexes avec des ligands organiques. Ces ligands organiques peuvent être de différentes sortes comme par exemple, les acides organiques produits par les organismes vivants comme les petits acides citrique, malique, oxalique et les plus importants sidérophores et phytosidérophores (ligands produits par les bactéries et certaines plantes pour prélever principalement le fer), les acides produits par la dégradation de la biomasse c'est à dire les substances humiques ou encore les acides produits pour usage anthropique comme l'EDTA.

Les groupements réactifs sont principalement des groupements carboxyliques ( $\text{R-COOH}$ ), phénoliques ( $\text{R-OH}$ ), amines ( $\text{R-NH}_2$ ), thiols ( $\text{R-SH}$ ) qui se déprotonent avec l'augmentation du pH. De la même manière, hormis substances humiques qui ne peuvent être décrit de

manière simple, des constantes de complexation ont été déterminées pour la plupart des acides organiques. Quelques exemples sont donnés dans le Tableau 4.

	$\text{Cu}^{2+}$		$\text{Zn}^{2+}$	
Citrate	CuL	7.2	ZnL	6.1
	CuHL	10.7	ZnL <sub>2</sub>	6.8
	CuH <sub>2</sub> L	13.8	ZnHL	10.3
	CuOHL	16.4	ZnH <sub>2</sub> L	13.3
EDTA	CuL	20.5	ZnL	18.3
	CuHL	23.9	ZnHL	21.7
	CuOHL	22.6	ZnOHL	19.9
MA (acide muginéique)	CuL	18.1	ZnL	12.7
DMA (acide déoxymuginéique)	CuL	18.7	ZnL	12.8

**Tableau 4:** Constantes de stabilité de complexation entre le cuivre et le zinc et quelques acides organiques<sup>53, 55</sup> en  $\log \beta$  (force ionique = 0 et à 25°C), l'acide muginéique et l'acide déoxymuginéique étant deux phytosidérophores.

### 2.2.3. Les substances humiques

Les substances humiques sont formées par la décomposition et la minéralisation incomplète de la biomasse. Dans les sols, les principales sources des substances humiques sont les végétaux terrestres, mais elles dérivent aussi des animaux et microorganismes. Ainsi, les substances humiques sont intrinsèquement hétérogènes et réfractaires et ne peuvent être décrites de manière simple. Elles sont classées selon trois fractions définies selon leur solubilité pendant l'extraction<sup>56</sup>: la fraction humine est insoluble à tous les pH, les acides humiques sont insolubles à pH acide mais solubles à pH neutre et basique et les acides fulviques sont solubles à tous les pH. Les proportions de ces différentes fractions varient fortement selon les environnements. Les environnements aquatiques contiennent une proportion plus importante d'acides fulviques alors que les environnements terrestres sont plus riches en acides humiques<sup>57</sup>. Leur composition chimique est d'environ 50 % de carbone, 30 à 40 % d'oxygène, de 2 à 7 % d'hydrogène, quelque pourcents d'azote et autour de 1 % de soufre<sup>57</sup>.

Les caractéristiques chimiques sont leur polydispersité, leur polyfonctionnalité et leur caractère polyélectrolyte<sup>58</sup>. La polydispersité signifie que les substances humiques présentent une

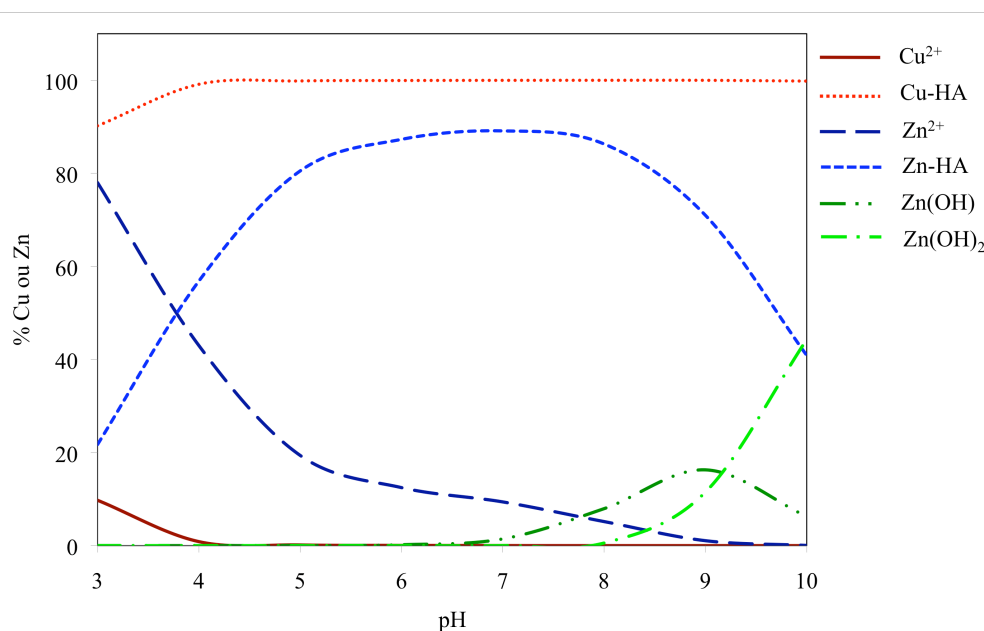
grande variabilité de poids moléculaires. Ainsi les acides fulviques ont des masses de 500-1500 D, les acides humiques des systèmes aquatiques des masses comprises entre 5000 et 10000 D et les acides humiques des sols des masses jusqu'à 30000 D et plus. Les substances humiques sont polyfonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles présentent un grand nombre de groupements fonctionnels différents. Les plus abondants sont les groupements carboxyliques et phénoliques mais il existe aussi des groupements sulfures, amines, etc... ce qui rend les substances humiques très hétérogènes chimiquement. Ces fonctions contiennent des protons qui peuvent, lors de leur dissociation, modifier la charge électrique de la molécule, lui donnant son caractère polyélectrolytique. La charge négative des substances humiques augmente graduellement avec le pH au fur et à mesure que les protons se dissocient. Les groupements fonctionnels carboxyliques se dissocient à pH acides et les groupements fonctionnels phénoliques sont déprotonés autour des pH neutres. Cette charge négative entraîne la formation d'interactions électrostatiques non-spécifiques avec les cations présents en solution.

Deux approches parallèles sont nécessaires pour une meilleure compréhension des substances humiques : une approche expérimentale pour obtenir des données de complexation des protons et des autres cations pour les substances humiques et une approche de modélisation pour comprendre et prédire le comportement des substances humiques dans l'environnement. Des titrations potentiométriques sont réalisées sur les substances humiques étudiées pour déterminer les constantes de complexation des protons. Pour comprendre les interactions entre substances humiques et autres cations, des isothermes à pH variable et concentrations de cations variables sont réalisées pour chaque cation. Ces données sont ensuite utilisées dans un modèle spécifique décrivant les substances humiques. Les modèles de complexation des cations avec les substances humiques doivent donc tenir compte de plusieurs points clés : la variabilité de la charge des substances humiques, l'hétérogénéité des groupements fonctionnels, donc des constantes de complexation, des substances humiques et les effets de compétition entre cations pour les sites réactifs. Les principaux modèles sont les modèles V et VI de Tipping et collaborateurs<sup>57</sup> et le modèle NICA-Donnan du groupe de Wageningen-Wallingford<sup>59-63</sup>. Le modèle NICA-Donnan a été utilisé au cours de cette thèse et les principales équations et paramètres sont présentés dans le Chapitre 2.

En exemple, la compétition entre le cuivre et le zinc pour la complexation avec un acide humique, modélisée avec le modèle NICA-Donnan, est représentée sur la Figure 4. Comme



illustré sur la Figure 4, le cuivre présente une grande affinité pour tous les complexants organiques, supérieure à celle du zinc. Si les deux métaux sont ensemble en présence d'un ligand organique, le cuivre sera complexé de manière plus importante que le zinc et à des pH plus acides. Aussi bien pour le cuivre que pour le zinc, la proportion de métal complexé avec l'acide humique augmente avec le pH. Dans le cas du zinc, les espèces hydroxylées commencent à apparaître à pH neutre et prennent de l'importance au delà de pH 9 alors que le cuivre reste fortement complexé à l'acide humique.



**Figure 4 :** Compétition du cuivre et du zinc pour la complexation avec un acide humique en fonction du pH à l'aide du modèle NICA-Donnan ( $\text{Cu}_{\text{Total}}$  et  $\text{Zn}_{\text{Total}}$  à  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$   $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  et acide humique à  $10^{-4} \text{ kg.L}^{-1}$ ). Les complexes avec les nitrates sont en concentration trop faible pour être visible.

#### 2.2.4. Adsorption

Dans les eaux naturelles, des particules solides sont toujours présentes en grand nombre et peuvent être de nature organique (algues, bactéries, fragments organiques) ou inorganiques (argiles, oxydes de fer,...). La plupart de ces particules présentent à leur surface des groupements fonctionnels de type R-OH, R-SH, R-COOH. Ces groupements permettent l'interaction avec les espèces dissoutes dont les métaux.

De la même manière que pour les substances humiques, les surfaces des particules étant rarement électriquement neutres, des interactions électrostatiques peuvent avoir lieu entre les surfaces et les ions métalliques. Les cations conservent leur sphère d'hydratation dans ce type de liaisons. Ces complexes sont appelés complexes de sphère externe.

Des liaisons covalentes peuvent aussi s'établir entre les ions métalliques et les sites à la surface des particules. La formation d'une liaison covalente s'accompagne du départ d'au moins une des molécules de la sphère d'hydratation de l'ion. Ces complexes sont appelés complexes de sphère interne.

La distance entre la surface de la particule et l'ion est donc différente dans chacun des deux cas.

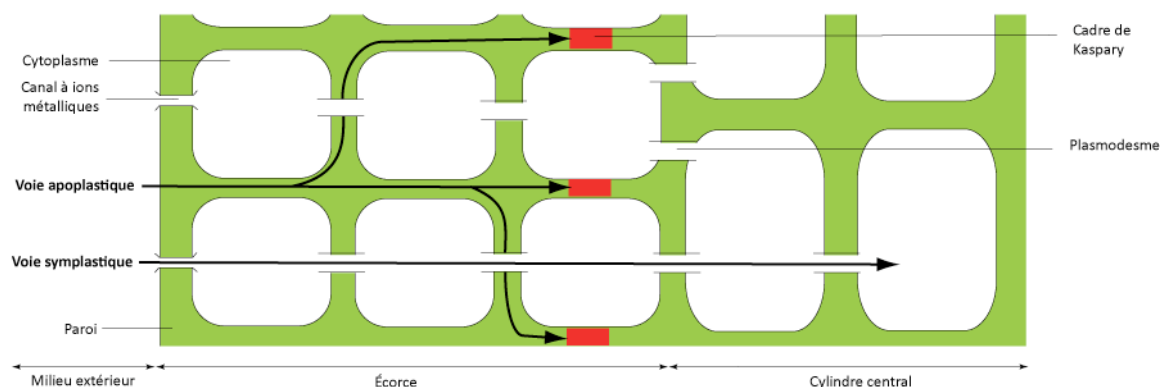
#### *2.2.5. Oxydo-réduction*

Les réactions d'oxydo-réduction sont des réactions chimiques au cours desquelles se produit un transfert d'électrons. Dès lors qu'aucun électron n'apparaît, chaque oxydation est accompagnée d'une réduction et vice-versa. De la même manière que les réactions acides-bases et les réactions de complexation, les équilibres d'oxydoréduction en solution peuvent être calculés.

Les principales réactions d'oxydoréduction ayant lieu dans l'environnement sont la photosynthèse, la respiration et de nombreuses réactions dans les organismes vivants, l'oxydation des roches et minerais par l'oxygène de l'atmosphère,... Le cuivre est plus susceptible que le zinc de subir des réactions d'oxydoréduction dans l'environnement.

#### *2.2.6. Prélèvement par les plantes*

Le prélèvement des métaux par les plantes est le résultat de deux phénomènes distincts : l'adsorption des métaux sur la surface des racines (compartiment apoplasmique) et l'absorption des métaux à l'intérieur des plantes. Le compartiment apoplasmique comprend le réseau des parois cellulaires, les espaces intercellulaires et les tissus vasculaires morts (Figure 5) dans la partie externe de la racine. Ce compartiment est chargé négativement, ce qui est dû principalement à la présence de sites carboxyliques et phénoliques<sup>64, 65</sup> et la complexation des métaux sur ces sites dépend du pH<sup>66</sup>.



**Figure 5 :** Schéma d'une coupe transversale de racine mettant en évidence les voies symplastique et apoplastique

Pour le prélèvement du fer, par exemple, deux stratégies ont été développées par les plantes pour réguler son absorption<sup>67</sup>. Les plantes de stratégie I (dicotylédones et monocotylédones à l'exception des graminées) réduisent le fer via des enzymes (des réductases membranaires) et, en parallèle, acidifient le milieu extérieur pour aider à solubiliser le fer pour finir par l'absorber grâce à des transporteurs de fer(II). Les plantes de stratégie II (les graminées) produisent des phytosidérophores, molécules chélatantes capables de fixer le fer(III), et absorbent le complexe fer(III)-phytosidérophore formé.

L'absorption du cuivre et du zinc par les plantes, c'est-à-dire leur prélèvement à travers les membranes racinaires, est encore un sujet peu connu. Elle a été essentiellement caractérisée pour la plante *Arabidopsis Thaliana* L.<sup>68-70</sup>, qui est une plante modèle en biologie et génétique végétale avec un cycle de vie court, une petite taille et un petit génome. Ainsi, des résultats acquis pour cette plante ne présument pas des mécanismes de prélèvement des autres plantes. A priori, le prélèvement racinaire concerne essentiellement la forme libre du métal. Le cuivre peut être prélevé via des transporteurs spécifiques du cuivre COPT1 (Copper Transporter) chez *Arabidopsis Thaliana* L.<sup>68, 69</sup>. Cependant, le cuivre doit être réduit avant le prélèvement par les transporteurs COPT1. Puig et al.<sup>70</sup> suggèrent que la réduction du cuivre ait lieu à la surface de la membrane induite via des protéines réductase FRO (Ferric Reductase Oxidase), également impliquées dans la réduction du fer pour les plantes de stratégie I, mais aucune observation n'a put le confirmer pour *Arabidopsis*. Des réductases différentes de celles du fer ont été induites par la déficience en cuivre dans le trèfle violet<sup>71</sup>, sans que les auteurs ne mesurent l'éventuelle réduction du cuivre lors du prélèvement par le trèfle. D'autres

transporteurs de métaux divalents de la famille des protéines ZIP (Zrt-Irt like Protein, avec Zrt et Irt signifiant Zinc-Regulated Transporter et Iron-Regulated Transporter) pourraient aussi contribuer au flux de cuivre vers la plante<sup>70, 72</sup>. Les protéines ZIP sont des transporteurs spécifiques du fer et du zinc<sup>73</sup> dont le rôle pour le zinc a été démontré pour *Arabidopsis*<sup>74</sup> et le riz<sup>75, 76</sup>. Les phytosidérophores produits par les plantes de stratégie II pour l'absorption du fer sont aussi capables de complexer le cuivre et le zinc<sup>77</sup>. Cependant, l'absorption des complexes Cu-phytosidérophore et Zn-phytosidérophore par les plantes reste controversée<sup>78-80</sup>. Plus généralement, les plantes sont toutefois capables de mobiliser et de prélever le cuivre et le zinc via des exudats racinaires<sup>81</sup>. La spéciation des métaux dans la solution du sol ou dans la solution nutritive semble pouvoir influencer la quantité de métal absorbé par les plantes. Ainsi, lorsque des chélateurs sont présents dans la solution, le prélèvement suit la tendance suivante : plus la constante de dissociation du complexe est importante plus le prélèvement sera important<sup>82</sup>. Weiss et al.<sup>83</sup> ont aussi observé l'influence sur le prélèvement racinaire de la spéciation du zinc dans la solution nutritive sans tendance claire toutefois.

#### 2.2.7. Transport dans les plantes

Dans les plantes, le transport longue distance du cuivre et du zinc semble surtout dépendre de chélatants, proches des phytosidérophores, du type de la nicotianamine. L'existence des complexes cuivre-nicotianamine et zinc-nicotianamine a été mesurée expérimentalement dans les conditions des fluides végétaux<sup>84</sup> et la modélisation a renforcé la nicotianamine comme principal transporteur des métaux dans le xylème et le phloème. L'influence de la nicotianamine a pu être démontrée pour le transport du cuivre dans la tomate<sup>85</sup> et pour le zinc, une étude<sup>86</sup> sur le riz a montré qu'un phytosidérophore jouait un rôle important dans la translocation du zinc en cas de déficience en zinc.

### 2.3. Mesures de spéciation

Différentes techniques ont été développées pour déterminer la spéciation des éléments en solution ou sur les particules, en mode dynamique ou à l'équilibre<sup>87, 88</sup>.

Les électrodes spécifiques ou ISE (Ion-selective electrodes) ont la particularité d'être recouvertes d'une membrane qui est sensible au métal étudié. En présence d'ions métalliques en solution, cette membrane répond en échangeant un de ses ions. Cet échange crée une variation dans la charge électrique de l'électrode et donc une différence de potentiel vis à vis d'une référence, qui peut être mesurée. Par exemple, le cuivre peut être mesuré par une électrode avec une membrane faite de CuS. Ces mesures sont réalisées à l'équilibre et ne prennent en compte que l'ion libre  $\text{Cu}^{2+}$ .

Les techniques de voltamétrie (DPASV, CSV) consistent en une réduction du métal étudié sur une électrode au mercure conduisant à la formation d'un amalgame métallique. Cet amalgame est ensuite oxydé pour quantifier le métal déposé sur l'électrode. Le métal libre ainsi que les espèces dynamiques peuvent être mesurés avec les techniques voltamétriques.

Les Gel-integrated voltametric microsensors (GIME) correspondent à une amélioration apportée à cette technique en recouvrant d'une fine couche de gel une ou plusieurs électrodes au mercure (voir aussi une couche de résine complexante (CGIME)). Elles sont plus fiables que la voltamétrie classique car les colloïdes au dessus de 30 nm sont exclus. Cependant, en dessous de 30 nm, les complexes labiles peuvent aussi être mesurés avec l'ion libre.

Un capteur DGT (Diffuse Gradients in Thin films) consiste en une résine recouverte d'une couche de gel en contact avec la solution à étudier. Un gradient de concentration s'établit dans le gel que les métaux traversent et ceux-ci s'accumulent dans la résine, qui agit comme un puits infini pour ces métaux. La labilité et les coefficients de diffusion des espèces pénétrants le gel déterminent la quantité de métal collecté dans la résine, qui, rapportée au temps de déploiement, donne un flux de métal. L'épaisseur de la couche du gel sera de grande importance pour déterminer le flux de métal et s'il n'est pas beaucoup plus grand que la couche de diffusion en solution, des complexes labiles peuvent contribuer au flux même sans pénétrer le gel. Le métal libre ainsi que les complexes labiles sont mesurés. Le dispositif DGT peut être installée in situ et permet la détermination simultanée de plusieurs éléments en solution.

La PLM (Permeation Liquid Membrane) consiste en une membrane située entre la solution à étudier et une solution receveuse. La membrane contient un agent complexant organique sélectif du métal étudié, ce qui permet d'entraîner ce métal de la solution étudiée vers la solution receveuse. En fonction des conditions expérimentales (flux contrôlée par diffusion en

solution ou diffusion dans la membrane), la mesure concernera soit le seul métal libre, soit le métal libre et ces formes dynamiques dans la solution.

La DMT (Donnan Membrane Technique), qui sera détaillée plus avant dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse, consiste en une membrane poreuse chargée négativement entre la solution à étudier et une solution receveuse. Seuls les ions chargés positivement peuvent donc traverser cette membrane et un équilibre s'établit entre la solution à étudier et la solution receveuse (de l'ordre de quelques jours). Récemment, une approche dynamique avec l'ajout d'un complexant dans la solution receveuse a permis de diminuer ce temps d'équilibration. A l'équilibre, seul le métal libre est mesuré alors que pour l'approche dynamique, cela dépend des conditions expérimentales. La DMT a aussi été adaptée pour mesurer la spéciation d'une solution en équilibre avec un sol<sup>34, 89</sup>. La DMT a été utilisée dans deux cas au cours de cette thèse : pour mesurer les coefficients de fractionnement isotopique du zinc se complexant avec un acide humique (Chapitre 3) et pour déterminer la spéciation en solution de solutions de sols contaminés en cuivre (Chapitre 5).

Dans les sols, une des méthodes les plus utilisées pour avoir un aperçu de la spéciation des métaux consiste en des mesures par extraction sélective<sup>90</sup>. Les extractions sélectives consistent en l'application successive de divers réactifs aux échantillons de sols et permettent de séparer les éléments selon 5 fractions : une fraction échangeable, une fraction carbonate (soluble dans l'acide), une fraction associée aux oxydes de fer et de manganèse (réductible), une fraction associée à la matière organique (oxydable) et une fraction résiduelle. La fraction échangeable est extraite par des sels ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , ...) ou avec l'EDTA et dans certains cas, semble corrélérer avec le prélèvement par les plantes. La fraction soluble dans l'acide est extraite par une solution d'acide acétique et est associée à la fraction carbonate. L'acide oxalique, l'hydroxylamine et la dithionite, de par leur potentiel de réduction, sont les réactifs les plus utilisés pour extraire la fraction complexée avec les oxydes de fer et de manganèse. A l'inverse, l'étape suivante consiste à oxyder l'échantillon à l'aide de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $\text{NaClO}$  et d'extraire principalement les éléments associés à la matière organique. La fraction résiduelle est récupérée par la digestion du résidu avec un mélange d'acides forts ( $\text{HF}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCl}$  et  $\text{HNO}_3$ ) et comprend principalement les métaux inclus dans la matrice des minéraux.

La technique de dilution isotopique<sup>91, 92</sup> peut aussi être utilisée pour mesurer la spéciation et par exemple, quantifier le métal échangeable dans un sol ou sur certains composants du sol<sup>91</sup>.

Ainsi, le sol en suspension est mis en présence d'une solution de concentration connue et de composition isotopique très différente de celle du milieu naturel. La solution à l'équilibre avec le sol après échange est mesurée et sa variation de composition isotopique nous informe sur la quantité de zinc échangeable.

A plus petite échelle, il est possible de déterminer les phases minéralogiques par des mesures de diffraction des rayons X. De plus, il est possible de créer des cartes de concentration des éléments sur des sections de sol à l'aide de  $\mu$ -SXRF (Synchrotron X-Ray Fluorescence). Les techniques utilisant les installations synchrotron comme l'EXAFS et le XANES permettent d'obtenir des informations à l'échelle moléculaire comme par exemple la distance entre l'atome étudié et ses plus proches voisins et la nature de ses voisins ou l'état d'oxydation de l'élément étudié.

### **3. Cycle anthropique**

#### **3.1. Historique**

Le cuivre est le deuxième métal à avoir été découvert par l'homme après l'or. Il est utilisé au moins depuis 5000 avant J.C. en Anatolie et en Asie. En Europe, une hache en cuivre a été retrouvée dans les Alpes sur un homme (Ötzi) autour de 3000 avant J.C. Un âge du cuivre (ou Chalcolithique) a même été défini en Europe entre 2500 et 1800 avant J.C. où l'usage des métaux restait cependant mineur en comparaison à celui de la pierre et de l'os. L'étape suivante d'utilisation du cuivre fut marquée par l'invention du bronze (alliage de cuivre et d'étain), en particulier pendant l'âge du bronze (en Europe autour de 3000 à 500 avant J.C.), et correspond au développement de la métallurgie. Jusqu'à l'époque actuelle, le cuivre restera un métal d'utilisation très courante. Le nom du cuivre (en latin *aes cyprium*) vient du nom latin de Chypre (*cyprius*) car Chypre était réputée pour ses mines de cuivre pendant l'Antiquité.

Le métal zinc n'a été découvert formellement que très tardivement. Il a par contre été utilisé en alliage avec le cuivre (le laiton) très tôt. La métallurgie du zinc s'est beaucoup développée en Asie par la suite et a été découverte au 14<sup>ème</sup> siècle en Inde et au 16<sup>ème</sup> siècle en Europe. La

première fonderie de zinc en Europe ne date que du 18<sup>ème</sup> siècle. Le nom zinc vient de l'allemand et signifie pointe acérée.

### 3.2. Minerais

Durant l'Antiquité, il était possible de trouver du cuivre à l'état natif, mais cela est devenu très rare actuellement. Les minéraux primaires qui contiennent du cuivre sont principalement des sulfures formés lors des processus hydrothermaux (la chalcoppyrite, la bornite et l'enargite). Les minéraux secondaires oxydés, formés à partir de l'oxydation des minéraux primaires, sont l'azurite, la malachite, la mélaconite et la cuprite. D'autres minéraux secondaires comme la covellite et la chalcocite existent. Les principaux minerais de cuivre sont présentés dans le Tableau 5.

Les principaux pays producteurs sont le Chili, l'Indonésie et les Etats-Unis d'Amérique et les principaux minerais exploités sont la chalcoppyrite, la bornite et la malachite.

Minéral	Composition	Cu (%)
Cuivre natif	Cu	100,0
Cuprite	Cu <sub>2</sub> O	88,8
Tenorite	CuO	79,9
Chalcoppyrite	Cu <sub>2</sub> S	79,9
Covellite	CuS	66,4
Bornite	Cu <sub>5</sub> FeS <sub>4</sub>	63,3
Malachite	Cu <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (OH) <sub>2</sub>	57,5
Azurite	2CuCO <sub>3</sub> .Cu(OH) <sub>2</sub>	55,3
Antlerite	Cu <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub>	53,7
Enargite	Cu <sub>3</sub> AsS <sub>4</sub>	49,0
Chrysocolle	CuSiO <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,2
Chalcoppyrite	CuFeS <sub>2</sub>	34,6

**Tableau 5:** Principaux minerais de cuivre et leur composition



Les minerais de zinc les plus courants sont exposés dans le Tableau 6 mais le principal minerai exploité est la sphalérite. La production de zinc provient majoritairement de la Chine, de l'Australie, du Pérou, du Canada et des Etats-Unis d'Amérique.

Minerai	Composition	Zn (%)
Sphalérite (blende)	ZnS	67,0
Zincite	ZnO	80,3
Franklinite	(Fe,Zn,Mn)(Fe,Mn) <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	15-20
Smithsonite	ZnCO <sub>3</sub>	52,0
Hydrozincite	Zn <sub>5</sub> (OH) <sub>6</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	56,0
Willemite	Zn <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	58,5
Hemimorphite	Zn <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O	54,2

**Tableau 6:** Principaux minerais de zinc et leurs compositions<sup>8</sup>

### 3.3. Propriétés physico-chimiques et utilisation par l'homme

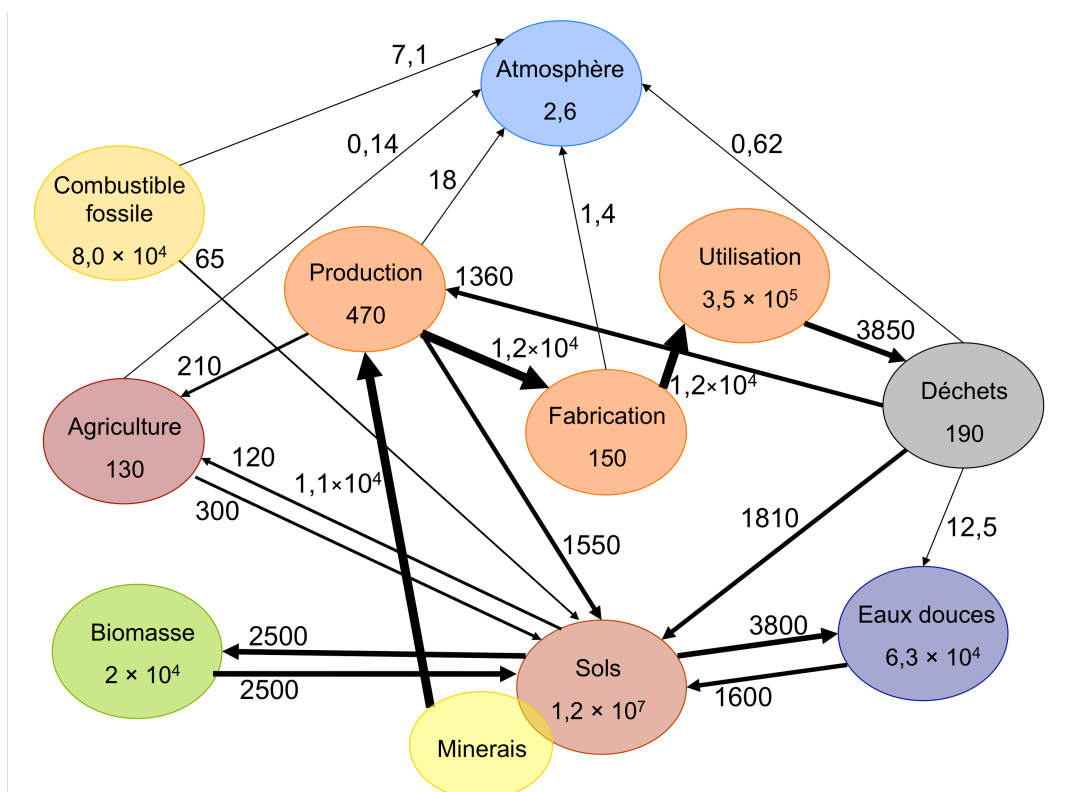
Le cuivre possède de nombreuses propriétés physico-chimiques qui expliquent ses multiples utilisations par l'homme. C'est un très bon conducteur électrique (seul l'argent lui est supérieur) et thermique. Il est donc très utilisé dans la fabrication du matériel électrique et les composants électroniques et rentre dans beaucoup d'éléments de chauffage, dans les centrales électriques, thermiques et nucléaires. De plus, le cuivre résiste bien à la corrosion et sert donc encore beaucoup pour les toitures et dans l'industrie. Il est aussi très malléable et en alliage avec l'étain (bronze), le zinc (laiton), le nickel et l'aluminium, il est facilement usinable. Pour finir, le cuivre est aussi connu pour ses propriétés bactéricides et fongicides qui sont utilisées pour l'agriculture, les applications marines, la tuyauterie...

La galvanisation de l'acier est la principale utilisation du zinc (environ 50% du zinc consommé). En effet, lorsque le zinc est en contact avec l'atmosphère, la couche la plus superficielle réagit pour former un carbonate de zinc qui protège les couches sous-jacentes. Le zinc est donc très résistant à la corrosion et sert à protéger l'acier. Le laiton, alliage de cuivre et de zinc est très employé pour le décolletage, le moulage, l'emboutissage, l'usinage de

nombreuses pièces pour utilisations industrielles et de la vie courante. Les oxydes de zinc peuvent aussi se trouver comme composant dans la fabrication de peintures, de produits pharmaceutiques, plastiques...

### 3.4. Sols contaminés

D'après Rauch et Grandel <sup>1</sup>, comme on peut le voir dans la Figure 6, le cuivre contenu dans le « réservoir » anthropique est plus important que le cuivre contenu dans la biomasse et les eaux douces. La majorité du cuivre rejeté par les activités anthropiques se retrouve dans les sols (le reste, négligeable, est rejeté vers l'atmosphère). Des échanges importants ont ensuite lieu entre les sols et la biomasse et entre le sol et les eaux douces.



**Figure 6** : Détails sur le cycle anthropique du cuivre <sup>1</sup>. Les flux sont exprimés en Gg de cuivre par an et les réservoirs de cuivre en Gg de cuivre.

### 3.4.1. Cuivre

Les quantités de cuivre appliquées dans les sols via les épandages de boues industrielles et agricoles, le traitement par la bouillie bordelaise ( $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$ ) de nombreuses zones agricoles et les rejets industriels amènent de nombreux sols à se trouver à des concentrations largement supérieures à celles du fond géochimique local. Han et al.<sup>93</sup> ont estimé la quantité cumulée de cuivre produite depuis le début de l'âge industriel à 451 millions de tonnes. Si le cuivre produit uniquement depuis 1950 était réparti équitablement sur les surfaces arables terrestres (0-10 cm), cela correspondrait à un apport de 217 mg de cuivre par kilo de sol.

De manière générale, le cuivre complexé aux divers types de matière organique compose une part importante voire majoritaire du cuivre dans les sols<sup>94-104</sup>. Les premières études réalisées par Strawn et al.<sup>101</sup>, Flogeac et al.<sup>100</sup>, et Karlsson et al.<sup>99</sup> en EXAFS sur le cuivre complexé à la matière organique ont montré que celui-ci formait des complexes de sphère interne avec la matière organique, c'est-à-dire des interactions spécifiques. Les oxydes de fer et d'aluminium ainsi que les fractions argileuses jouent aussi un rôle important pour la complexation du cuivre dans les sols<sup>94, 96, 97, 105, 106</sup>.

L'influence de la spéciation du cuivre « contaminant » sur sa biodisponibilité a été mise en relief par Ginocchio et al.<sup>107</sup>. Ainsi, la bouillie bordelaise, les poussières de fonderie et les résidus sableux sont les plus susceptibles de relarguer du cuivre dans l'environnement car ils contiennent principalement du cuivre sous forme  $\text{CuSO}_4$  anhydre ou hydraté. L'addition de ces composés dans les sols va les acidifier fortement et favorisera les formes solubles et donc biodisponibles du cuivre. En revanche, les scories, les résidus très concentrés en cuivre ou les minéraux contiennent plutôt du cuivre insoluble et sont donc potentiellement moins biodisponibles.

McBride et al.<sup>103</sup> se sont intéressés à des sols ayant subi un fort impact d'épandage de boues 15 ans auparavant (ces boues avaient une concentration en cuivre autour de 1000 ppm). Ces sols présentent à ce jour des concentrations en cuivre (390 ppm) approximativement treize fois plus élevées que celle du sol contrôle (30 ppm). La solution du sol des sols contaminés est aussi plus enrichie en cuivre (0.56 ppm) que celle du sol contrôle (0.027 ppm) et sa spéciation serait contrôlée principalement par des colloïdes organiques. Il est à noter que sur l'ensemble du cuivre apporté par les boues, environ 40 % a déjà été perdu des couches

supérieures du sol et qu'il existe un risque important de transfert des métaux vers les couches profondes du sol, les écosystèmes aquatiques et les plantes.

La bouillie bordelaise utilisée pour lutter contre le mildiou, maladie cryptogamique qui touche principalement la vigne, la pomme de terre et la tomate, contient du cuivre sous forme soluble qui se retrouve dans les sols. Les sols viticoles, mis sous forte pression de cuivre, ont donc été très étudiés pour évaluer l'étendue de la contamination en cuivre et l'éventuelle mobilité du cuivre vers les plantes et le système aquatique. Brun et al.<sup>108</sup> ont ainsi mesuré des concentrations en cuivre allant jusqu'à 250 ppm dans des sols de l'Hérault alors que le fond géochimique local se situe entre 14 et 29 ppm. Chaignon et al.<sup>109</sup> ont obtenu des valeurs comprises entre 22 et 398 ppm à proximité de Montpellier et Michaud et al.<sup>110</sup> sur des sols proches ont mesuré jusqu'à 1030 ppm pour des zones servant au remplissage des conteneurs de bouillie bordelaise. Des sols de la région de Champagne (Besnard et al.<sup>96</sup>) ont ainsi des concentrations de surface en cuivre pouvant aller jusqu'à 519 ppm pour les sols amendés en cuivre et en fragments végétaux, pour un fond géochimique local de 20 ppm. Dans ces sols, l'apport de cuivre par la bouillie bordelaise a été estimé à 1500-3000 kg.ha<sup>-1</sup> pour le siècle dernier, correspondant à 870-1870 kg.ha<sup>-1</sup> de cuivre dans les 40 premiers centimètres du sol. 40 % du cuivre aurait donc été perdu de la part supérieure du sol, principalement par érosion, les concentrations en profondeur étant similaires à celle du fond géochimique. Fernandez-Calvino et al.<sup>94</sup> ont aussi montré le transfert du cuivre des sols viticoles vers les sédiments au pieds des vallées. Les sols viticoles mesurés dans le nord de l'Espagne ont des concentrations en cuivre comprises entre 42 et 583 ppm et les sédiments situés aux pieds des pentes des concentrations entre 73.9 et 947 ppm, avec un facteur d'enrichissement compris entre 1,2 et 5,6.

#### 3.4.2. Zinc

Actuellement, la majorité des recherches sur les métaux dans les sols portent sur les sols contaminés ou sur le transfert des métaux vers les plantes. En effet, les flux anthropiques, directs (engrais, pesticides, déchets, épandages) et indirects (retombées atmosphériques), sont des sources importantes de zinc dans l'environnement et ont modifié la concentration de zinc dans les sols. Han et al.<sup>93</sup> ont estimé la quantité de zinc produite en cumulé depuis le début de l'ère industrielle à 354 millions de tonnes. Si le zinc produit entre 1950 et 2000 était équitablement réparti sur l'ensemble des surfaces arables terrestres (0-10 cm), cela

correspondrait à un apport de 170 mg de zinc par kilo de sol. En général, le zinc est principalement associé aux oxydes de fer et aux argiles<sup>8</sup>. Si le sol est riche en matière organique et selon le pH, le zinc pourra y être, et si le sol est plutôt calcaire, le zinc pourra être fortement associé aux carbonates.

Lee et al.<sup>111</sup> se sont intéressés à un sol à proximité d'une autoroute. La concentration en zinc atteint 2861 ppm juste à côté de l'autoroute pour ensuite décroître en s'en éloignant. La concentration en zinc des sols non contaminés aux alentours est de l'ordre de 34 ppm. Juillot et al.<sup>112</sup> ont étudié deux sols à proximité d'une usine de plomb et de zinc dans le nord de la France. L'un est agricole et l'autre boisé et plus proche de l'usine. Le fond géochimique local est de 60 ppm pour le zinc, ce qui est dans la moyenne des sols français. À la surface, les deux sols présentent des concentrations largement supérieures au fond géochimique avec une concentration de 571 ppm de zinc pour le sol agricole et de 1380 ppm pour le sol boisé. Le sol agricole ne contient pas de zinc échangeable et 28 % de zinc associé au compartiment organique tandis que le sol boisé contient 12 % de zinc échangeable et 21 % de zinc « organique ».

Cancès et al.<sup>89</sup> se sont intéressés à la solution du sol correspondant au sol boisé contaminé étudié par Juillot et al.<sup>112</sup>. En fonction du montage expérimental (Donnan Membrane avec différents rapports sol/solution), la concentration en zinc de la solution du sol est comprise entre 1,5 et 0,4 ppm dont 70 à 100 % sous forme  $Zn^{2+}$ . Stephan et al.<sup>113</sup> ont étudié 66 sols canadiens et européens avec des pHs variant de 4.09 à 7.96 et des concentrations en zinc total dans le sol de 11 à 3610 ppm. Avec une méthode différente de celle précédemment évoquée (Anodic Stripping Voltammetry), ils obtiennent une proportion de  $Zn^{2+}$  de 7 % en moyenne, de zinc lié à la matière organique dissoute de 80 % et de zinc labile de 13 % en moyenne.

Toutes ces études montrent bien la complexité des sols et l'importance de la spéciation des métaux dans l'environnement, ainsi que la forme sous laquelle ils sont introduits dans l'environnement.

## 4. Géochimie isotopique

Le fractionnement isotopique est principalement dû aux différences entre les énergies de vibration des molécules et cristaux. La fréquence des vibrations d'une liaison dépend de la masse des atomes et sera donc différente pour différents isotopes. En pratique, plusieurs règles gouvernent le fractionnement à l'équilibre des isotopes stables :

- En général, le fractionnement à l'équilibre diminue quand la température augmente.
- Toutes choses égales par ailleurs, le fractionnement isotopique est plus important pour les éléments légers et pour les isotopes avec des masses très différents.
- A l'équilibre, les isotopes lourds d'un élément ont tendance à se concentrer dans les substances avec lesquelles l'élément forme les liaisons chimiques les plus fortes. L'amplitude du fractionnement isotopique est grossièrement proportionnelle à la différence de force de liaison de l'élément entre les deux substances. Cette propriété est corrélée à i) l'importance du degré d'oxydation de l'élément, ii) les liaisons avec des éléments de forte électronégativité, iii) les liaisons fortement covalentes entre deux éléments de même électronégativité, iv) pour les éléments de transition, la configuration électronique « low spin » et v) un petit nombre de coordination.

Les rapports isotopiques de cuivre et de zinc s'expriment dans cette étude selon l'équation suivante :

$$\delta^{65}\text{Cu} = \left( \frac{\left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{echantillon}}}{\left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ pour le cuivre et}$$
$$\delta^{66}\text{Zn} = \left( \frac{\left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{echantillon}}}{\left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ pour le zinc.}$$

Le zinc possédant 5 isotopes, il est possible d'exprimer aussi les compositions isotopiques en  $\delta^{68}\text{Zn}$ ,  $\delta^{67}\text{Zn}$  et  $\delta^{70}\text{Zn}$  ou en  $\delta^{68/66}\text{Zn}$  en prenant le  ${}^{66}\text{Zn}$  en dénominateur. Puisque les rapports isotopiques sont exprimés relativement à un standard de référence, le choix du standard est donc de première importance lors de la mesure de compositions isotopiques dans

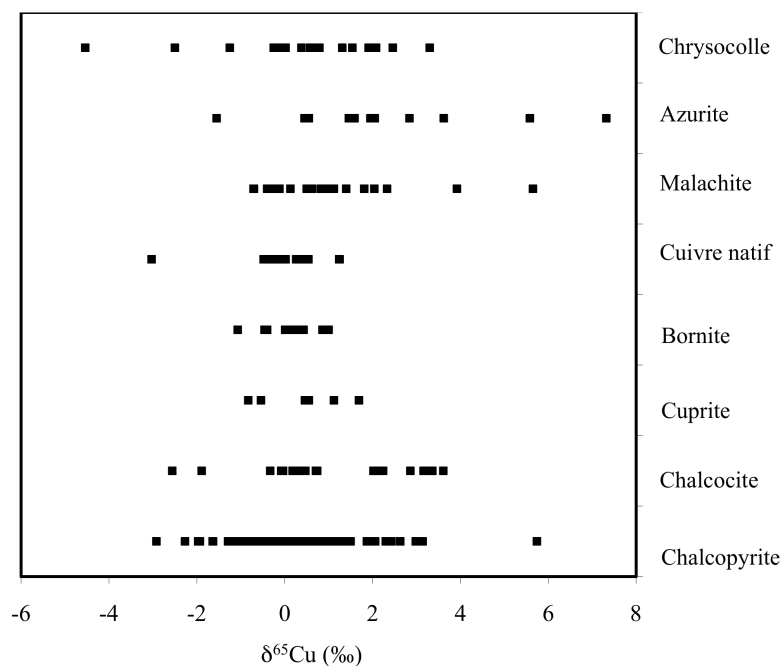
l'environnement mais sera de moindre importance lors d'expériences en laboratoire. Les standards utilisés sont discutés dans le Chapitre 2.

Pour comparer deux compositions isotopiques A et B ou pour s'affranchir des différences relatives entre standards, il est possible d'exprimer des variations isotopiques à l'aide de la notation  $\Delta$ , qui est ici exprimée pour le cuivre :

$$\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{A-B}} = \delta^{65}\text{Cu}_{\text{A}} - \delta^{65}\text{Cu}_{\text{B}}$$

## 4.1. Cuivre

### 4.1.1. Réservoirs

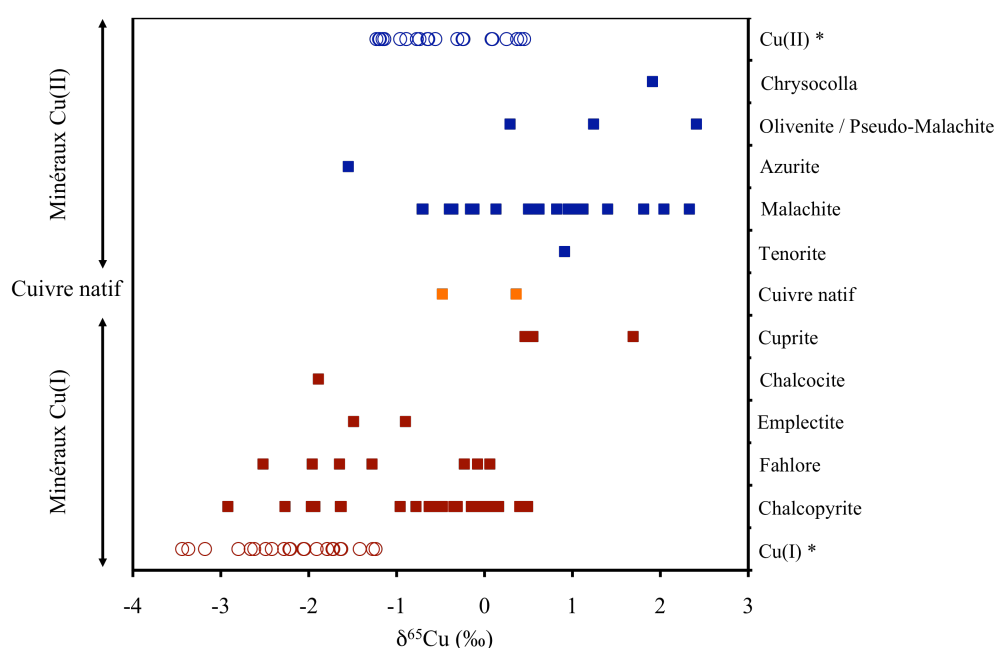


**Figure 7:** Compositions isotopiques des principaux minerais de cuivre<sup>114-121</sup>

Les études les plus abondantes en isotopie du cuivre sont celles concernant les roches riches en cuivre<sup>114-123</sup>. Dans la Figure 7, sont représentés les minéraux riches en cuivre clairement identifiés (chalcopyrite, chalcocite, etc...). Ils exhibent une très grande variation de composition isotopique. Si l'on rajoute les échantillons contenant plusieurs phases ou ayant subi une forte altération, les valeurs mesurées vont de -16,49 à 9,98 ‰ pour les plus extrêmes (chalcocite + oxides et turquoise respectivement). Ces valeurs extrêmes sont toutefois à

prendre avec précaution car elles n'ont été mesurées dans aucun autre échantillon. La variabilité des compositions isotopiques du cuivre pour un même minéral est considérable, probablement du fait de sources et de processus différents. Les fractionnements isotopiques entre minéraux doivent donc être considérés dans le contexte précis de chaque étude et non de manière globale.

Ainsi, Markl et al.<sup>119</sup> ont montré des variations importantes de l'ordre de 6 ‰ (-3,3 à 2,5 ‰) du  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans des veines hydrothermales en fonction de l'état d'oxydation du cuivre dans les minéraux.



**Figure 8:** Rapports isotopiques du cuivre en fonction de l'oxydation du cuivre sur des minéraux de cuivre dans des veines hydrothermales (figurés par des carrés noirs) dans l'étude de Markl et al.<sup>119</sup> et dans des assemblages de minéraux riches en cuivre (figurés par des ronds noirs vides) dans l'étude d'Asael et al.<sup>116</sup>.

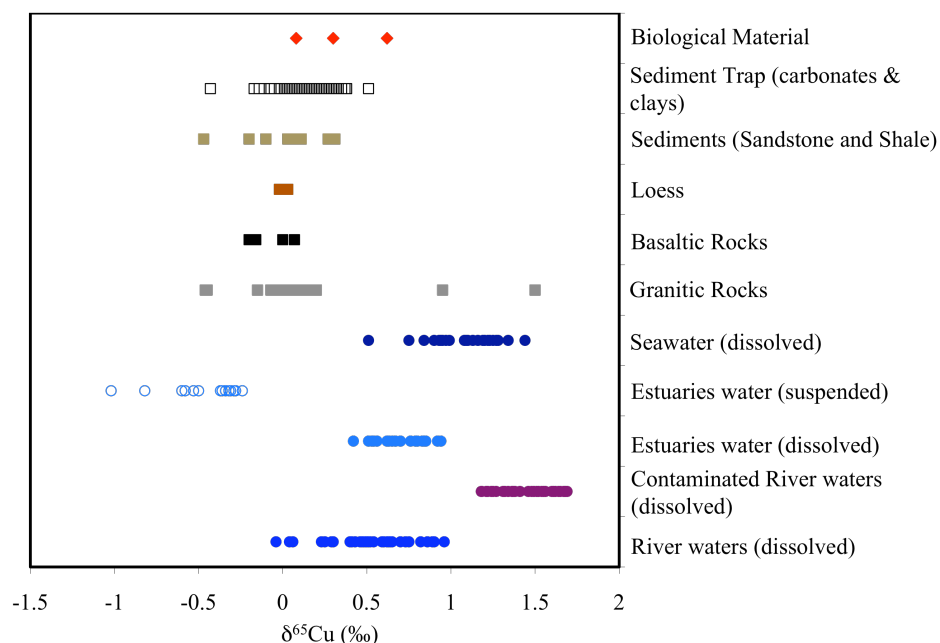
Comme on peut le voir dans la Figure 8, les minéraux oxydés ont globalement une signature isotopique plus enrichie en isotopes lourds que les minéraux réduits. Néanmoins, la gamme de compositions isotopiques obtenue est grande et est interprétée par Markl et al.<sup>119</sup> comme le résultat de plusieurs processus : les réactions d'oxydo-réduction en solution et la précipitation des minéraux.



De même, Asael et al.<sup>116</sup> ont systématiquement fait des mesures séparées pour les minéraux oxydés et réduits dans les différentes formations d'une région du sud d'Israël (Figure 8). Dans la formation précambrienne les minéraux oxydés ont une composition entre -0,77 et 0,45 ‰ et ceux réduits entre -3,44 et -1,63 ‰. Dans la formation cambrienne, les minéraux oxydés ont eux une composition comprise entre -1,23 et -0,24 ‰ alors que celles des minéraux réduits se situe entre -3,18 et -1,24 ‰. A nouveau, les minéraux oxydés sont systématiquement plus enrichis en isotopes lourds que les minéraux réduits. Ceci a aussi été observé à plus petite échelle sur des sphérules de sulfures de cuivre où la couche extérieure oxydée est enrichie en isotopes lourds par rapport à la partie centrale réduite<sup>116</sup>.

Auparavant, Mason et al.<sup>124</sup> et Rouxel et al.<sup>125</sup> ont observés des variations de compositions isotopiques dans des systèmes hydrothermaux ancien et actuel. Les fractionnements isotopiques significatifs ont été associés à des processus d'oxydoréduction, le signal ayant été fortement perturbé par des réactions d'altération/précipitation.

Les réservoirs terrestres et extraterrestres de cuivre, ne présentant pas d'intérêt commercial, commencent à être caractérisés. Les premières mesures isotopiques dans des échantillons lunaires ont été réalisées par Moynier et al.<sup>126</sup>. Elles révèlent des variations importantes entre les différents matériaux avec une valeur de 1,40 ‰ dans les basaltes lunaires, de -0,50 ‰ dans les verres lunaires et entre 2,61 et 4,51 ‰ dans les sols lunaires. Moynier et al.<sup>126</sup> interprètent les rapports basaltiques comme étant hérités du matériau source, l'enrichissement en isotopes légers dans les verres comme étant dû aux processus pendant les éruptions et l'enrichissement en isotopes lourds dans les sols comme étant dû à un ensemble de processus comme la vaporisation de micro-météorites et l'impact de particules solaires de haute énergie. Les météorites de fer ont des valeurs comprises entre -0,49 et 0,49 ‰<sup>127</sup>. Dans le cas des chondrites ordinaires, leurs rapports isotopiques sont compris entre -0,51 et 0,10 ‰ alors que pour les chondrites carbonées, ils sont compris entre -1,51 et -0,03 ‰<sup>128</sup>. A partir de l'étude des chondrites, Luck et al.<sup>128</sup> proposent la présence d'au moins deux réservoirs de cuivre isotopiquement distincts dans le système solaire primitif.



**Figure 9:** Gamme des compositions isotopiques du cuivre dans les matériaux terrestres (Archer et al.<sup>129</sup>, Asael et al.<sup>116</sup>, Ben Othman et al.<sup>130</sup>, Borrok et al.<sup>131</sup>, Graham et al.<sup>114</sup>, Kimball et al.<sup>123</sup>, Larson et al.<sup>115</sup>, Li et al.<sup>132</sup>, Maher et al.<sup>117</sup>, Maréchal et al.<sup>118</sup>, Maréchal<sup>133</sup>, Markl et al.<sup>119</sup>, Mathur et al.<sup>120</sup>, Rouxel et al.<sup>125</sup>, Vance et al.<sup>134</sup>, Zhu et al.<sup>121, 135</sup>)

Les compositions isotopiques des principaux matériaux terrestres, à l'exception des roches riches en cuivre, sont répertoriées dans la Figure 9. Ben Othman et al.<sup>130</sup> ont déterminé les compositions isotopiques d'échantillons de MORB pour les trois océans et obtiennent une valeur moyenne proche de 0 ‰. Le basalte de référence BCR1, qui est un basalte continental, a une composition isotopique de  $0,07 \pm 0,08$  ‰<sup>129</sup>. Maréchal et al.<sup>136</sup> ont mesuré un basalte de l'Ile de la Réunion et obtiennent une valeur de -0,03 ‰. Les premières mesures sur des granites provenant du sud-est de l'Australie ont été publiées par Li et al.<sup>132</sup> avec des valeurs variant entre -0,46 ‰ et 1,51 ‰. Cependant, la majorité des granites a des valeurs proches de 0 ‰ avec une moyenne de  $0,01 \pm 0,30$  ‰ (en excluant deux valeurs anormales les plus élevées). Li et al.<sup>132</sup> ont aussi mesuré des loess chinois qui, avec des valeurs de -0,02 ‰ et de 0,03 ‰, restent aussi autour de 0 ‰. Si l'on considère les granites et les basaltes comme représentatifs d'un réservoir terrestre alors celui-ci aurait donc une composition de référence proche de 0 ‰. Des grès et des schistes ont été mesurés dans une formation cambrienne<sup>116</sup> et ont un rapport isotopique moyen de  $0,09 \pm 0,24$  ‰ (valeurs comprises entre -0,47 et 0,45 ‰). Les seules données sur les sédiments récents pour l'isotopie du cuivre ont été obtenues par

Maréchal<sup>118, 136</sup> sur des échantillons provenant de pièges à sédiments dans l'océan Atlantique (principalement des argiles, des carbonates et de la matière organique). La valeur isotopique moyenne obtenue est de l'ordre de  $0,17 \pm 0,23$  ‰. Les roches les plus importantes à la surface de la terre mesurées à ce jour ont donc des valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  proches de 0 ‰, voire légèrement supérieures.

Les mesures isotopiques du cuivre mais également du zinc dans les milieux aquatiques sont difficiles du fait de la faible concentration de ces éléments dans une matrice relativement voire très chargée en autres éléments. Cependant, des adaptations techniques<sup>137, 138</sup> ont permis l'obtention de mesures précises. Les compositions isotopiques du cuivre dans les rivières n'ont donc commencé à être mesurées que très récemment<sup>131, 134, 139</sup>. Vance et al.<sup>134</sup> ont étudié les grands fleuves (Amazone, Tocantins, Missouri, Ottawa, Nile, Volga, Kalix, Brahmapoutre, Chang Jiang et une rivière du Kamchatka) et ont obtenu une gamme de valeurs entre 0,02 et 1,45 ‰ pour la phase dissoute. Aucune tendance ne semble se dessiner à part deux faits intéressants : i) des valeurs clairement différentes des autres pour le Chang Jiang, fleuve contaminé (de 1,23 à 1,45 ‰) et ii) une différence systématique entre les mesures prises entre la saison sèche et la saison humide pour les différentes branches du Nil au Soudan (valeurs du  $\delta^{65}\text{Cu}$  plus positives pendant la saison humide, avec  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{humide-sec}}$  de 0,33 ‰ en moyenne). Vance et al.<sup>134</sup> constatent que la composition isotopique en cuivre des rivières est globalement plus lourde que celle de la source potentielle naturelle du cuivre (pour celles qui ont été mesurées à l'heure actuelle : les granites<sup>132</sup>, les basaltes<sup>129, 130, 136, 140</sup>, les loess<sup>132</sup>).

Les eaux de rivières drainant des zones minières ont été étudiées par Borrok et al.<sup>131</sup> et Kimball et al.<sup>123</sup>. Pour le drainage minier acide étudié par Kimball et al.<sup>123</sup> dans le Colorado, les compositions isotopiques de la fraction dissoute varient entre 1,38 et 1,69 ‰ avec une moyenne de  $1,59 \pm 0,19$  ‰. Borrok et al.<sup>131</sup> obtiennent des résultats comparables pour la rivière Fisher Creek dans le sud du Colorado avec une moyenne de  $1,43 \pm 0,32$  ‰. En revanche, pour deux rivières du sud de l'Espagne, Rio Tinto et Rio Odiel, leurs compositions sont exceptionnellement basses,  $-0,45 \pm 0,66$  ‰ et  $-0,74 \pm 0,27$  ‰ respectivement. Toutefois, les mesures isotopiques des rivières Rio Tinto et Rio Odiel sont à prendre avec précaution. En effet, ce sont des échantillons très riches en sulfate et il est possible que les mesures isotopiques aient été affectées par un biais de masse par ces sulfates (communication personnelle de D. Borrok). Ainsi sur la Figure 9, les données de Borrok et al.<sup>131</sup> pour les

rivières Rio Tinto et Rio Odiel ne sont pas représentées. Les données obtenues par Borrok et al.<sup>131</sup> et Kimball et al.<sup>123</sup> pour les rivières affectées par les drainages miniers acides sont similaires à celles obtenues par Vance et al.<sup>134</sup> dans un fleuve très anthropisée (Chang Jiang).

Bermin et al.<sup>138</sup> ont réalisé les premières mesures sur une colonne d'eau de mer du Pacifique Nord-Est (station P4) et un échantillon de la Manche. Les valeurs dans la colonne d'eau du Pacifique sont comprises entre 0,84 et 1,45 ‰ dans la phase dissoute avec une augmentation du  $\delta^{65}\text{Cu}$  entre 0 et 100 m de profondeur puis une baisse des valeurs jusqu'à la profondeur maximale étudiée de 400 m. La mesure de l'échantillon de la Manche a pour valeur 0,75 ‰. Vance et al.<sup>134</sup> ont retrouvé des valeurs similaires pour la Manche (0,75 ‰) et la station P4 du Pacifique Nord-Est (0,95 à 1,25 ‰) avec une tendance semblable dans le Pacifique (augmentation puis diminution des valeurs avec la profondeur). Toutefois, une autre station du Pacifique (P26) affiche des valeurs similaires (0,97 à 1,28 ‰) mais aucune tendance significative avec la profondeur ; de même avec une station dans l'Océan Indien central avec des valeurs entre 0,90 et 1,44 ‰<sup>134</sup>.

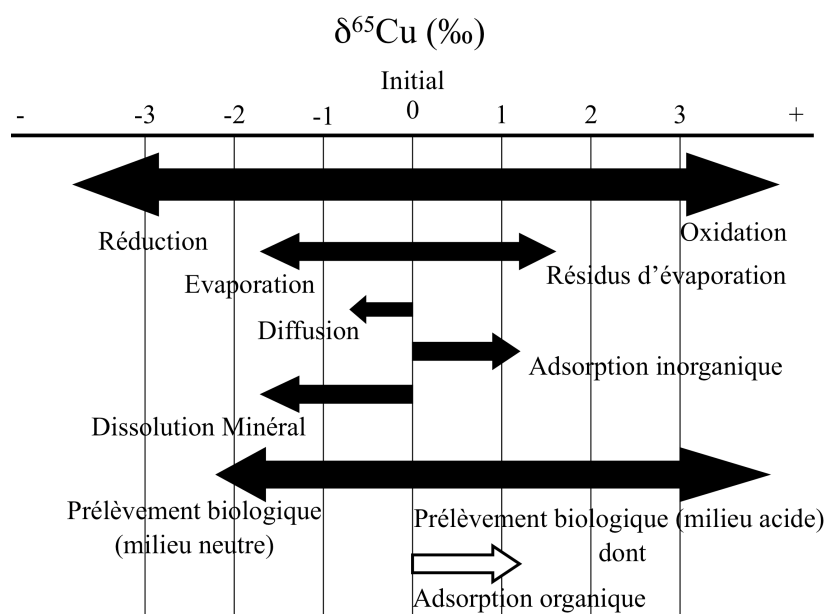
Des mesures séparées ont été réalisées dans des estuaires dans le sud-est de l'Angleterre dans les fractions dissoute et particulaire (Figure 9)<sup>134</sup>. Dans la fraction dissoute, les compositions sont comprises entre 0,42 et 0,94 ‰ avec une valeur moyenne de 0,69 ‰ alors que les compositions sont comprises entre -1,02 et -0,24 ‰ pour la fraction particulaire (valeur moyenne de -0,47 ‰). La fraction dissoute des estuaires a donc une signature similaire à celle de la fraction dissoute des rivières et est enrichie en isotopes lourds par rapport à la fraction particulaire. Vance et al.<sup>134</sup> interprètent cette différence par la formation de complexes très forts entre le cuivre et de petites molécules organiques de la fraction dissoute au sein des systèmes aquatiques, favorisant l'enrichissement en isotopes lourds dans la phase dissoute. Ainsi, comme pour les rivières, les compositions isotopiques mesurées dans l'océan sont toujours enrichies en isotopes lourds relativement aux principales roches terrestres (granites, basaltes). De plus, les compositions océaniques sont dans la gamme supérieure des compositions des rivières, voire partiellement supérieures si l'on exclut les valeurs du Chiang Jiang.

Les seules mesures concernant les êtres vivants ont été réalisées par Maréchal et al.<sup>118</sup> et Zhu et al.<sup>135</sup> sur des moules, du sang humain et des protéines du sang de poulpe. Dans les deux premiers cas, les compositions sont proches du standard avec des valeurs de 0,08 ‰ et 0,30

‰ pour les moules et le sang humain respectivement. Pour les protéines du sang de poulpe, la valeur est plus élevée (0,62 ‰), ce que Zhu et al.<sup>135</sup> interprètent comme le reflet d'une signature de l'eau de mer plus élevée.

#### 4.1.2. Processus

Les rapports isotopiques d'un élément peuvent être modifiés par les processus qui vont les affecter au cours des cycles biogéochimiques. Nous nous focaliserons sur les processus ayant été étudiés et les plus susceptibles de se produire dans les environnements de surface (rivières, sols, sédiments,...). L'amplitude des fractionnements isotopiques pour les principaux processus quantifiés pouvant affecter le cuivre est présentée dans la Figure 10. Certains processus comme le prélèvement biologique sont le reflet de plusieurs processus (adsorption, diffusion, effets cinétiques...).



**Figure 10:** Principaux processus qui provoquent un fractionnement isotopique du cuivre. La longueur des flèches indique l'étendue des fractionnements isotopiques mesurés.

Les réactions d'oxydoréduction ont été les premières à être étudiées. Zhu et al.<sup>135</sup> ont utilisé la réaction du Cu(II) avec l'iode qui coprécipitent sous forme CuI, dans lequel le cuivre sera réduit. Le précipité CuI est enrichi en isotopes légers par rapport au cuivre en solution. Le fractionnement moyen entre le Cu(II) et le Cu(I) pour les différentes conditions expérimentales est de  $4,02 \pm 1,33$  ‰. Un montage expérimental assez proche a été mis en

place par Ehrlich et al.<sup>141</sup> pour étudier le fractionnement isotopique entre le cuivre oxydé Cu(II) en solution et la covellite, un sulfure de cuivre réduit (Cu(I)S). Il consiste à faire précipiter la covellite en conditions anoxiques à partir d'un excès de sulfate de cuivre et d'un ajout de soufre. A 20°C, le fractionnement moyen obtenu entre Cu(II) et Cu(I) est de  $3,06 \pm 0,14$  ‰, ce qui est proche de ce qu'ont pu mesurer Zhu et al.<sup>135</sup>. Ces résultats sont cohérents et confirment les mesures effectuées dans les études de Markl et al.<sup>119</sup> et d'Asael et al.<sup>116</sup> : le cuivre oxydé présente des  $\delta^{65}\text{Cu}$  plus élevés que ceux du cuivre réduit.

La précipitation d'hydroxyde de cuivre expérimentée par ailleurs par Ehrlich et al.<sup>141</sup> provoque un fractionnement beaucoup plus faible avec un  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Cu(II)}-\text{Cu(OH)}_2}$  de  $0,28 \pm 0,02$  ‰.

Mathur et al.<sup>120</sup> et Kimball et al.<sup>123</sup> se sont intéressés à la dissolution expérimentale et naturelle de minéraux de cuivre en milieu acide en présence ou non de bactéries. Pour les dissolutions abiotiques, Mathur et al.<sup>120</sup> mesurent un enrichissement en isotopes lourds de la solution lessivant les minéraux avec un  $\Delta_{\text{Minéral-Lessivage}}$  de -2,74 ‰ pour la dissolution de la chalcocite ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) et de -1,32 ‰ pour celle de la chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ). Kimball et al.<sup>123</sup> obtiennent des résultats similaires aussi bien sur le terrain : -1,43 ‰ et -1,60 ‰ pour la chalcopyrite et l'énargite ( $\text{Cu}_3\text{AsS}_4$ ) respectivement, qu'expérimentalement : -1,37 ‰ pour la chalcopyrite et -0,98 ‰ pour l'énargite. Quand des bactéries sont ajoutées (*Thiobacillus ferrooxidans* ou *Acidithiobacillus ferrooxidans*), les résultats sont significativement différents. Pour les expériences de Mathur et al.<sup>120</sup>, aucun fractionnement n'est observé entre le lixiviat et le minéral initial (chalcocite ou chalcopyrite), ce qui implique un enrichissement en isotopes lourds dans les bactéries. De même, Kimball et al.<sup>123</sup> n'observent aucun fractionnement pour l'énargite et par contre, un fractionnement en sens inverse est observé pour la chalcopyrite ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Minéral-Lessivage}}$  de 0,57 ‰). Les auteurs expliquent aussi ces résultats comme un prélèvement préférentiel des isotopes lourds du cuivre par les bactéries.

L'effet de micro-organismes sur le fractionnement isotopique du cuivre a aussi été étudié par Pokrovsky et al.<sup>142</sup>. Les micro-organismes étudiés sont des bactéries aérobies rhizosphériques, des bactéries aquatiques phototrophiques et des diatomées marines et lacustres. L'incorporation du cuivre dans les diatomées (marines et lacustres) à pH 7,5-8 ne semble provoquer aucun fractionnement systématique à  $\pm 0,2$  ‰. Il en est de même pour les bactéries aquatiques à tous les pH étudiés et pour les bactéries de sol à pH supérieur à 4. Aux pHs

inférieurs à 4, le prélèvement du cuivre par les bactéries du sol provoque un fractionnement  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Solide-Solution}}$  de  $-1,2 \pm 0,5 \text{ ‰}$ , les bactéries ayant prélevé plutôt des isotopes légers.

Des expériences réalisées sur des protéines montrent aussi un enrichissement en isotopes légers sur les protéines<sup>135</sup>. Pour des protéines extraites d'*Escherichia Coli*, les expériences in vitro indiquent un fractionnement de 1,53 ‰ en faveur des isotopes légers dans des protéines azurine. Ces protéines contiennent du cuivre et ont un cycle d'utilisation des deux états d'oxydoréduction du cuivre ( $\text{Cu(I)} \leftrightarrow \text{Cu(II)}$ ). Dans le cas d'une expérience in-vivo, le fractionnement est plus faible (0,98 ‰), dû à l'ajout d'au moins une étape supplémentaire pour le prélèvement du cuivre par la protéine. Zhu et al.<sup>135</sup> ont aussi étudié des levures et en particulier la différence de fractionnement entre deux protéines coexistant à l'intérieur des levures contenant du cuivre. Dans les deux cas et comme précédemment, les protéines prélèvent préférentiellement les isotopes légers. Cependant, celles qui contiennent uniquement du cuivre réduit Cu(I) montrent un fractionnement plus élevé ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Selcuivre-Protéine}}$  de -1,18 ‰) que celles contenant du cuivre oxydé Cu (II) et réduit Cu(I) ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Selcuivre-Protéine}}$  de -1,71 ‰), confirmant l'importance de l'état redox du cuivre pour les rapports isotopiques. En plus des réactions d'oxydoréduction, des effets cinétiques peuvent provoquer un enrichissement en isotopes légers dans le cuivre prélevé par les protéines.

L'adsorption du cuivre sur quelques oxy(hydr)oxydes a été effectuée par Pokvrovsky et al.<sup>142</sup> et Balistreri et al.<sup>143</sup>. Contrairement aux bactéries, l'adsorption du cuivre sur la goethite à pH compris entre 4 et 5 conduit à un enrichissement en isotopes lourds de  $0,78 \pm 0,2 \text{ ‰}$  en  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Solide-solution}}$ . Le fractionnement est un peu plus important pour la gibbsite avec  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Solide-solution}}$  de  $1,00 \pm 0,25 \text{ ‰}$ . Pour un oxyhydroxyde de fer amorphe (ferrihydrite), Balistreri et al.<sup>143</sup> ont trouvé un résultat très proche de celui de Pokvrovsky et al.<sup>142</sup> pour la goethite avec un  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Solide-solution}}$  de 0,73 ‰.

Ainsi, si de nombreuses études ont été réalisées sur les minerais de cuivre d'intérêt économique et sur les processus d'adsorption, les premiers résultats sur les sédiments, sur les eaux (douces et salées) et sur les processus aux interfaces biologiques restent à confirmer, des réservoirs comme la biomasse, les activités anthropiques ainsi que nombre de processus biologiques ou aux interfaces restent à caractériser. De plus, il est nécessaire de relier les expériences réalisées en laboratoire en conditions contrôlées à des mesures sur le terrain intégrant un grand nombre de processus et la variabilité du milieu naturel.

## 4.2. Zinc

L'état de l'art sur les signatures isotopiques en zinc des différents réservoirs et composants terrestres a déjà été réalisé par Cloquet et al.<sup>144</sup> et complété par Chen<sup>2</sup>. Seuls les résultats les plus pertinents pour la compréhension de notre étude seront donc détaillés ici.

### 4.2.1. Compositions isotopiques

Le cycle biogéochimique du zinc étant fortement influencé par les apports anthropogéniques, les mesures d'isotopie du zinc dans l'environnement ont principalement été menées dans des zones fortement impactées par les êtres humains<sup>22, 42, 145-148</sup>. Weiss et al.<sup>148</sup> se sont intéressés à plusieurs profils de tourbières en fonction de leur proximité d'une fonderie ou d'une mine. Les profils étudiés présentent des variations importantes de compositions isotopiques du zinc avec des valeurs de  $\delta^{66}\text{Zn}$  entre 0,32 et 1,70 ‰. Ces variations semblent refléter plusieurs processus et sources : le dépôt de zinc atmosphérique, le prélèvement par les plantes et la diagenèse. La signature isotopique des activités anthropogéniques est identifiable, mais est susceptible d'être modifiée par des processus nécessitant encore des études. Dolgoplova et al.<sup>147</sup> ont étudié des lichens et des roches/minéraux à proximité de mines et obtiennent des valeurs de  $\delta^{66}\text{Zn}$  entre 0,4 et 1,4 ‰ dans les lichens et entre -0,4 et 1,2 ‰ dans les granites et minéraux du site. La plupart des granites ont des  $\delta^{66}\text{Zn}$  compris entre -0,4 et 0,8 ‰, les lichens ont donc en moyenne des valeurs plus positives que celles des matériaux géologiques des alentours. Les valeurs les plus élevées des lichens sont interprétées comme étant dues à des apports atmosphériques de sources lointaines, anthropogéniques ou non. Cloquet et al.<sup>42</sup> montrent que la majorité des lichens mesurés de la région de Metz (-0,2 à 0,5 ‰) a une composition similaire à celles des aérosols urbains ( $0,12 \pm 0,21$  ‰) et des rejets de l'usine d'incinération d'ordures ménagères de la région ( $0,13 \pm 0,12$  ‰) et que les lichens ayant les valeurs les plus négatives seraient associés à un trafic automobile plus important. Ces études montrent l'intérêt que présentent les isotopes du zinc pour la détermination des contaminations mais aussi la complexité d'interprétation des signatures isotopiques mesurées dans le milieu naturel.

En revanche, dans le cas de sites à proximité de fonderies de zinc, les variations des signatures isotopiques du zinc sont importantes. Ainsi, une rivière drainant une exploitation



industrielle d'un minerai de zinc a été isotopiquement caractérisé par Sivry et al.<sup>145</sup>. Les sédiments en amont de l'exploitation ont une signature en  $\delta^{66}\text{Zn}$  de  $0,31 \pm 0,06$  ‰ alors que les sédiments en aval dans la rivière et dans le barrage sont significativement plus élevés, avec des valeurs entre 0,75 et 1,35 ‰. Ce fractionnement est dû aux processus métallurgiques ayant lieu dans la fonderie, car les résidus de zinc de la fonderie sont isotopiquement fractionnés par rapport au minerai initial, et ce jusqu'à 1,33 ‰. L'intensité du fractionnement isotopique dans ces résidus peut être liée au rendement d'extraction du minerai. Les changements de pratique au cours du temps pour l'extraction du minerai sont même visibles dans les carottes de sédiments. De même, Sonke et al.<sup>146</sup> ont observé un enrichissement en isotopes lourds du zinc dans des résidus d'extraction par rapport au minerai initial et lors de sa transmission dans des colonnes de sédiments. Sortant des cheminées d'usines, les poussières contenant du zinc sont enrichies en isotopes légers, ce qui peut aussi influencer les compositions isotopiques du zinc des sols aux alentours par retombées atmosphériques<sup>145</sup>.

Dans la Seine, qui est un fleuve avec un bassin versant drainant une zone très anthropisée et avec des concentrations importantes en métaux, les isotopes du zinc ont été utilisés pour discerner les différentes sources de pollution en zinc<sup>22</sup>. Les variations isotopiques de la phase dissoute sont significatives ( $\delta^{66}\text{Zn}$  de 0,07 à 0,58 ‰) spatialement le long d'un transect des sources jusqu'à l'estuaire et temporellement à Paris. Le zinc dissous dans la Seine est considéré comme ayant un comportement conservatif ce qui permet à Chen et al.<sup>22</sup> de déterminer la part de zinc anthropique dans la phase dissoute de la Seine (90 %). A Paris, les sources anthropiques de zinc ont des compositions isotopiques différentes ( $\delta^{66}\text{Zn}$  de -0,04 ‰ pour les ruissellements d'eau sur les toits, de -0,11 ‰ pour le ruissellement sur la route, de 0,28 ‰ pour les eaux usées, de 0,06 ‰ pour les eaux industrielles traitées et entre -0,10 et 0,42 pour les engrais) de celle de la principale source naturelle du zinc dissous (le calcaire avec un  $\delta^{66}\text{Zn}$  de 0,88 ‰). Une étude complémentaire a été réalisée sur la phase particulaire par Chen et al.<sup>149</sup>, qui obtiennent des  $\delta^{66}\text{Zn}$  compris entre 0,30 et 0,08 ‰ lors d'un transect d'amont en aval. Des mesures d'une série temporelle à Paris montrent les mêmes variations (de 0,08 à 0,26 ‰). Ces variations sont inversement proportionnelles au facteur d'enrichissement en zinc. La source naturelle en zinc, d'origine silicatée, présente une composition isotopique de 0,35 ‰ et les sources naturelle autour de 0,10 ‰. De même que pour la phase dissoute, Chen et al.<sup>149</sup> expliquent ces variations par un mélange de sources différentes et non par le fractionnement dû à des processus d'adsorption.

Un environnement relativement vierge d'activités anthropiques a fait l'objet d'une étude par Viers et al.<sup>150</sup>. Trois profils de sols montrent des variations isotopiques du zinc différentes selon leur composition chimique et leur régime d'érosion. Le sol de marécage ne présente pas de fractionnement par rapport à la roche mère. Pour les sols typiques à flanc de colline développés sur une roche mère granitique de  $\delta^{66}\text{Zn}$  à 0,4 ‰, deux tendances ont été observées : en profondeur, peu ou pas de fractionnement ( $\delta^{66}\text{Zn}$  de 0,5 ‰) et en surface, une déperdition des isotopes lourds ( $\delta^{66}\text{Zn}$  de 0,0 ‰) par rapport à la roche mère. La litière, quant à elle, a une composition plus riche en isotopes lourds que le niveau de sol sous-jacent avec un  $\delta^{66}\text{Zn}$  de 0,12 à 0,25 ‰. Pour toutes les plantes mesurées sur ces sols, l'enrichissement en isotopes lourds est manifeste ( $\delta^{66}\text{Zn}$  de 0,51 à 0,75 ‰) par rapport à la litière. De même, toutes les feuilles mesurées sont enrichies en isotopes légers par rapport aux tiges. En revanche, les tiges ont un comportement plus complexe et ne sont pas forcément enrichies en isotopes légers par rapport aux sols.

#### 4.2.2. Processus

De même que pour le cuivre, un certain nombre d'études ont été effectuées sur les différents processus affectant le zinc dans l'environnement et en particulier sur l'adsorption du zinc sur de nombreux supports. Pokrovsky et al.<sup>151</sup> ont été les premiers à étudier l'adsorption du zinc sur six oxydes et hydroxydes (fer, aluminium et manganèse) en fonction du pH. Dans cette étude, le décalage isotopique entre le minéral et la solution en équilibre avec ce minéral ne semble pas dépendre du pH pour la majorité des minéraux et le  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solide-Solution}}$  est égal à  $-0,20 \pm 0,03$  pour la goethite,  $-0,17 \pm 0,06$  pour la birnessite,  $0,10 \pm 0,03$  pour la pyrolusite,  $0,10 \pm 0,09$  pour le corindon et  $0,13 \pm 0,12$  ‰ pour l'hydroxyde d'aluminium. Dans le cas de l'hématite, Pokrovsky et al.<sup>151</sup> observent un  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solide-Solution}}$  de  $0,61 \pm 0,10$  ‰ à pH 5,5 et de  $0,02 \pm 0,09$  ‰ de pH 5,8 à 6,7. Plus récemment, Balistrieri et al.<sup>143</sup> et Juillot et al.<sup>152</sup> se sont aussi intéressés à l'adsorption du zinc sur la ferrihydrite et la goethite. Les deux études sont cohérentes pour la ferrihydrite avec un  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solide-Solution}}$  de 0,52 et de 0,53 ‰ pour Balistrieri et al.<sup>143</sup> et pour Juillot et al.<sup>152</sup> respectivement. Dans le cas de la goethite, les résultats de Juillot et al.<sup>152</sup> avec un  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solide-Solution}}$  de 0,29 ‰ sont en contradiction avec ceux de Pokrovsky et al.<sup>151</sup> (-0,20 ‰). Or ceux de Juillot et al.<sup>152</sup> sont renforcés de mesures EXAFS, appuyant l'enrichissement en isotopes lourds des phases formant les liaisons les plus fortes

(ici avec la goethite). En résumé, il semblerait que, dans l'état de nos connaissances, l'adsorption du zinc sur les oxy(hydr)oxydes favorise plutôt l'incorporation des isotopes lourds sur les minéraux.

Gélabert et al.<sup>153</sup> ont caractérisé le fractionnement isotopique associé à l'interaction du zinc avec des diatomées. Son incorporation irréversible dans différents types de diatomées amène à un enrichissement en isotopes lourds dans les diatomées par rapport à la solution compris entre 0,08 et 0,27 ‰ en fonction du type de diatomée. La sorption du zinc à la surface des cellules de diatomées provoque un fractionnement avec un  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solide-Solution}}$  de 0,27 et de 0,43 ‰ pour deux diatomées considérées. Concernant la sorption à la surface de frustules en silice, les isotopes lourds sont encore favorisés sur la surface siliceuse ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solide-Solution}}$  de 0,35 ‰). John et al.<sup>154</sup> se sont aussi intéressés aux diatomées et mesurent aussi un enrichissement en isotopes lourds à la surface de ces algues. Quand seul le zinc internalisé dans les diatomées est mesuré, John et al.<sup>154</sup> observent un enrichissement en isotopes légers. Pour les faibles concentrations en zinc, correspondant à une internalisation via un des transporteurs de haute affinité, le  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Diatomée-Solution}}$  est de -0,2 ‰ alors que lorsque la concentration en zinc est importante et que le prélèvement se fait via des transporteurs de basse affinité, le  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Diatomée-Solution}}$  est -0,8 ‰.

Contrairement au cuivre, des études ont déjà été réalisées sur le fractionnement isotopique du zinc associé à son prélèvement par les plantes. Weiss et al.<sup>83</sup> ont fait pousser des plantes (laitue, tomate et riz) en hydroponie en milieu contrôlé avec deux types de solution nutritive et deux concentrations en zinc. Un léger enrichissement en isotopes lourds est observable sur les racines par rapport à la solution nutritive ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Racines-Solution}}$  de 0,04 à 0,09 ‰) pour toutes les plantes tandis que la tendance s'inverse entre parties aériennes et racines ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PartiesAériennes-Racines}}$  de -0,13 à -0,26 ‰). Pour le prélèvement du zinc par les racines, l'amplitude du fractionnement isotopique est similaire pour les trois types de plantes. Pour la translocation (passage du zinc des racines aux parties aériennes), la tomate présente le fractionnement le plus important (-0,26 ‰) et le riz le fractionnement le moins important (-0,13 ‰). La composition chimique de la solution et la spéciation du zinc en solution influence le fractionnement isotopique observé. Ainsi, lorsque le zinc est très fortement complexé dans la solution nutritive (dans cette étude, 99% du zinc est complexé avec du NTA et du HEDTA), le fractionnement isotopique observé entre racines et parties aériennes est plus

marqué ( $-0,15$  to  $-0,26$  ‰) que lorsque la proportion de zinc libre est plus importante (35 % de zinc libre donne un fractionnement compris entre  $-0,13$  et  $-0,18$  ‰)<sup>83</sup>. Moynier et al.<sup>155</sup> ont étudié les premiers stades de croissance de lentilles et de bambous (5 et 14 jours de croissance respectivement). Pour les lentilles, le temps de croissance très court ne permet que de mesurer la graine initiale et la tige. Cette première tige est enrichie en isotopes légers par rapport à la graine ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Tige-Graine}}$  de  $-0,34$  ou  $-0,21$  ‰, pour les expériences en salle propre ou non). A ce stade de croissance, le fractionnement observé dans les lentilles est dû uniquement au transport dans la plante car deux expériences avec zinc ou sans zinc dans la solution nutritive ajoutée amène exactement au même résultat. Pour le bambou, aucun fractionnement n'est mesurable entre les rhizomes et les tiges, mais un enrichissement important en isotopes légers a lieu entre les tiges et les feuilles ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Tige-Graine}}$  entre  $-0,71$  et  $-1,07$  ‰). Moynier et al.<sup>155</sup> interprètent ces résultats comme un fractionnement dû à la diffusion dans les fluides végétaux ou dû au passage à travers les membranes biologiques.

## 5. Objectifs de l'étude

Nous avons décrit dans les trois parties précédents l'importance du compartiment organique dans l'environnement, ce qui nous a permis de mettre en évidence la nécessité de caractériser les signatures isotopiques associés aux réactions avec ses différents composants (matière organique, algues, bactéries, plantes, mammifères,...). Aucune mesure isotopique n'a été réalisée sur des mesures de complexation du cuivre et du zinc avec de la matière organique, ni sur le transfert du cuivre dans les plantes, alors que ces deux processus influencent la spéciation de ces éléments et certainement la composition isotopique de l'ion libre en équilibre avec ces complexants. Dans le cadre de cette thèse, je me suis donc focalisée sur ces deux processus essentiels. Les questions que l'on se pose sont les suivantes :

- Les isotopes du zinc fractionnent-ils lorsqu'ils sont en présence de matière organique, c'est à dire la complexation du zinc avec la matière organique conduit-elle à une différenciation isotopique entre zinc libre et zinc complexé ?
- Le prélèvement du cuivre par les plantes amène-t-il un fractionnement isotopique ? Le transport dans la plante est-il lui aussi synonyme de variations de composition isotopique ?

- Si un fractionnement isotopique est mesuré dans ces deux cas, de combien est-il et évolue-t-il avec différents facteurs expérimentaux ?

Pour se faire, les données ont été obtenues à partir d'une approche expérimentale :

- Adaptation de la technique de la membrane de Donnan (DM) pour les mesures isotopiques et utilisation de cette technique pour la séparation du zinc libre et du zinc complexé avec la matière organique (acide humique purifié).
- Expérimentation en hydroponie et sur sols pour l'étude du prélèvement du cuivre et du zinc par deux plantes (blé et tomate).
- Mesure de spéciation avec la DM des sols utilisés lors de la culture des plantes.

Cette approche expérimentale a été combinée avec des outils de modélisation (modèle NICA-Donnan, code ECOSAT et Fluxy), ceci afin de mieux comprendre les systèmes étudiés (quels sites sont sollicités lors de la complexation sur la matière organique, quelle est la spéciation de la solution nutritive et celle de la solution du sol,...) mais aussi pour la prédiction de l'influence de ces processus dans le milieu naturel (modélisation du fractionnement isotopique du zinc dans la phase dissoute d'une rivière, étudiée par J. Chen dans sa thèse au sein de l'IPGP).

Les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus seront présentés dans l'ordre suivant :

- Dans le Chapitre 2, les montages expérimentaux, les outils de mesure et de modélisation seront décrits.
- Le Chapitre 3 présente les résultats obtenus sur le fractionnement isotopique du zinc associé à sa complexation avec la matière organique en utilisant la DM et leur application à la modélisation du fractionnement isotopique du zinc dans un milieu naturel (article soumis à Environmental Science & Technology).
- L'étude du fractionnement isotopique du cuivre et du zinc associé au prélèvement par des plantes (blé et tomate) cultivées en hydroponie et avec l'aide du code de calcul Fluxy est exposée dans le Chapitre 4, sous la forme d'un article en anglais.
- Dans le Chapitre 5, nous nous sommes focalisés sur le fractionnement isotopique du cuivre associé au prélèvement par le blé lors d'expériences de croissance sur sol. Ces résultats sont mis en relation avec des mesures de spéciation de la solution du sol et de la modélisation via le code ECOSAT, sous la forme d'un article en anglais.

### Literature Cited

1. Rauch J. N.; Graedel T. E., Earth's anthropobiogeochemical copper cycle. *Global Biogeochemical Cycles* **2007**, *21*, GB2010.
2. Chen J. La contamination métallique de la Seine et des rivières de son bassin. Université Paris Diderot - Institut de Physique du Globe de Paris, Paris, 2008.
3. Albarède F., The stable isotope geochemistry of copper and zinc. In *Geochemistry of non-traditional stable isotopes*, Johnson C. M.; Beard B. L.; Albarède F., Eds. Mineralogical Society of America Geochemical Society: 2004; Vol. 55, pp 409-427.
4. Allègre C. J.; Mahnès G.; Lewin E., Chemical composition of the Earth and the volatility control on planetary genetics. *Earth and Planetary Science Letters* **2001**, *185*, 49-69.
5. Gaillardet J.; Dupré B.; Allègre C. J., Geochemistry of large river suspended sediments: Silicate weathering or recycling tracer? *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1999**, *63*, 4037-4051.
6. Gaillardet J.; Viers J.; Dupré B., Trace elements in river waters. In *Treatise in Geochemistry - Surface and ground water, weathering and solids*, 2005; Vol. 5.09, pp 225-272.
7. Lohan M. C.; Statham P. J.; Crawford D. W., Total dissolved zinc in the upper water column of the subarctic North East Pacific. *Deep-Sea Research Part II* **2002**, *49*, 5793-5808.
8. Nriagu J. O., *Zinc in the environment*. Wiley Interscience: 1980.
9. Nriagu J. O.; Pacyna J. M., Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **1988**, *333*, 134-139.
10. McDonough W. F.; Sun S.-s., The composition of the earth. *Chemical Geology* **1995**, *120*, 223-253.
11. Witt-Eickschen G.; Palme H.; O'Nions H. S. C.; Allan C., The abundances of volatile elements in the earth's mantle: new evidence from analyses of mantle xenoliths. *Lunar and Planetary Science* **2007**, *38*, 1536.
12. Michaud A. Interaction entre biodisponibilité, phytotoxicité du cuivre et nutrition en fer de graminées - mécanismes physiologiques et rhizosphériques -. INRA - Montpellier SupAgro, Montpellier, 2007.
13. Eisler R. *Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review*; USGS: 1993; p 126.
14. Broadley M. R.; XHite P. J.; Hammond J. P.; Zelko I.; Lux A., Zinc in plants. *New Phytologist* **2007**, *173*, 677-702.

15. Rudnick R. L.; Fountain D. M., Nature and composition of the continental crust: a lower crustal perspective. *Reviews in Geophysics* **1995**, 33, 267-309.
16. Plank T.; Langmuir C. H., The chemical composition of subducting sediment and its consequences for the crust and mantle. *Chemical Geology* **1998**, 145, 325-394.
17. Nriagu J. O., *Copper in the environment*. New York, 1980; p 536.
18. Georgopoulos P. G.; Roy A.; Yonone-Lioy M. J.; Opiekun R. E.; Lioy P. J. *Copper : Environmental dynamics and human exposure issues*; The International Copper Association: 2001.
19. Steinnes E.; Allen R. O.; Petersen H. M.; Rambaek J. P.; Varskog P., Evidence of large scale heavy-metal contamination of natural surface soils in Norway from long-range atmospheric transport. *The Science of the Total Environment* **1997**, 205, 255-266.
20. Deboudt K.; Flament P.; Bertho M-L., Cd, Cu, Pb and Zn concentrations in atmospheric wet deposition at a coastal station in western Europe. *Water, Air, and Soil Pollution* **2004**, 151, 335-359.
21. Nguyen V. D.; Merks A. G. A.; Valenta P., Atmospheric deposition of acid, heavy metals, dissolved organic carbon and nutrients in the dutch Delta area in 1980-1986. *The Science of the Total Environment* **1990**, 99, 77-91.
22. Chen J.; Gaillardet J.; Louvat P., Zinc isotopes in the Seine river waters: A probe of anthropogenic contamination. *Environmental Science and Technology* **2008**, 42, 6494-6501.
23. Zwolsman J. J. G.; Van Eck G. T. M.; Van der Waijden C. H., Geochemistry of dissolved trace metals (cadmium, copper, zinc) in the Sheldt Estuary, southwestern Netherlands: Impact of seasonal variability. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1997**, 61 (8), 1635-1652.
24. Zwolsman J. J. G.; van Eck G. T. M., Geochemistry of major elements and trace metals in suspended matter of the Scheld estuary, southwest Netherlands. *Marine Chemistry* **1999**, 66, 91-111.
25. Stevenson C.; Ng B., Distribution of copper, nickel and zinc in the Thames Estuary. *Marine Pollution Bulletin* **1999**, 38 (4), 328-331.
26. Saager P. M.; de Baar H. J. W.; de Jong J. T. M.; Nolting R. F.; Schijf J., Hydrography and local sources of dissolved trace metals Mn, Ni, Cu and Cd in the northeast Atlantic Ocean. *Marine Chemistry* **1997**, 57, 195-216.
27. Nolting R. F.; de Baar H. J. W.; Timmermans K. R.; Bakker K., Chemical fractionation of zinc versus cadmium among other metals nickel, copper and lead in the northern North Sea. *Marine Chemistry* **1999**, 67, 267-287.
28. Davies N. T.; Benett B. G., Exposure of man to environmental copper: An exposure contaminant assessment. *Science of the Total Environment* **1985**, 46, 215-228.

29. Baize D., information sur les éléments traces dans les sols en France. INRA, Orléans: 2008.
30. Sauvé S.; Dumestre A.; McBride M.; Hendershot W., Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. *Environmental Technology and Chemistry* **1998**, *17*, 1481-1489.
31. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Lofts S.; Tipping E.; Van Riemsdijk W. H., Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. *Environmental Science and Technology* **2002**, *36*, 4804-4810.
32. Vulkan R.; Zhao F.; Barbosa-Jefferson V.; Preston S.; Paton G. I.; Tipping E.; McGrath S. P., Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environmental Science and Technology* **2000**, *34*, 5115-5121.
33. Doelsch E.; Van de Kerchove V.; Saint Macary H., Heavy metal content in soils of Réunion (Indian Ocean). *Geoderma* **2006**, *134*, 119-134.
34. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Van Riemsdijk W. H., Determination of the free ion concentration of trace metals in soil solution using a soil column Donnan membrane technique. *European Journal of Soil Science* **2001**, *52*, 629-637.
35. Abdallah M. A. M.; abdallah A. M. A., Biomonitoring study of heavy metals in biota and sediments in the South Eastern Coast of Mediterranean sea, Egypt. *Environmental Monitoring Assessment* **2008**, *146*, 139-145.
36. dos Santos I. R.; Silva-Filho E. V.; Shcafer C.; Sella S. M.; Silva C. A.; Gomes V.; Passos M. J. de A. C. R.; Van Ngan P., Baseline mercury and zinc concentrations in terrestrial and coastal organisms of Admiralty Bay, Antarctica. *Environmental Pollution* **2006**, *140*, 304-311.
37. Ozden O.; Erkan N.; Cengiz Deval M., Trace mineral profiles of the bivalve species *Chamelea gallina* and *Donax trunculus*. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 222-226.
38. Turkmen M.; Turkmen A.; Tepe Y.; Tore Y.; Ates A., Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 233-237.
39. Eisler R. *Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review*; USGS: 1998; p 120.
40. Lippo H.; Poikolainen J.; Kubin E., The use of moss, lichen and pine bark in the nationwide monitoring of atmospheric heavy metal deposition in Finland. *Water, Air and Soil Pollution* **1995**, *85*, 2241-2246.
41. Ng O.-H.; Tan B. C.; Obbard J. P., Lichens as bioindicators of atmospheric heavy metal pollution in Singapore. *Environmental Monitoring and Assessment* **2005**, *123*, 63-74.
42. Cloquet C.; Carignan J.; Libourel G., Isotopic composition of Zn and Pb atmospheric depositions in an urban/periurban area of northeastern France. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*, 6594-6600.



43. Ivanov G. M.; Kashin V. K.; Ubugunov V. L., Copper in the main components of western Transbaikalia landscapes. *Geochemistry International* **2004**, *44*, 494-500.
44. Kabata-Pendias A.; Galczynska B.; Dudka S., Baseline zinc content of soils and plants in Poland. *Environmental Geochemistry and Health* **1989**, *11*, 19-24.
45. Kirchner P.; Biondi F.; Edwards R.; McConnell J. R., Variability of trace metal concentrations in Jeffrey pine (*Pinus jeffreyi*) tree rings from the Tahoe Basin, California, USA. *Journal of Forest Research* **2008**, *13*, 347-356.
46. Andersen M. K.; Raulund-Rasmussen K.; Strobek B. W.; Hansen H. C. B., The effects of tree species and site on the solubility of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in soils. *Water, Air, and Soil Pollution* **2004**, *154*, 357-370.
47. Dell B., Copper nutrition of *Eucalyptus maculata* Hook. seedlings: Requirements for growth, distribution of copper and the diagnosis of copper deficiency. *Plant and Soil* **1994**, *166*, 181-187.
48. Hoffland E.; Wei C.; Wissuwa M., Organic anion exudation by lowland rice (*Oryza sativa* L.) at zinc and phosphorus deficiency. *Plant and Soil* **2006**, *283*, 155-162.
49. Sheldon A. R.; Menzies N. W., The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil* **2005**, *278*, 341-349.
50. McBride M. B., Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *Journal of Environmental Quality* **2001**, *30*, 78-84.
51. McFarlane G. R.; Burchett M. D., Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Environmental Research* **2002**, *54* (1), 65-84.
52. IUPAC, Atomic weights of the elements: Review 2000. *Pure Applied Chemistry* **2003**, *75*, 683-800.
53. Sigg L.; Behra P.; Stumm W., *Chimie des milieux aquatiques : Chimie des eaux naturelles et des interfaces de l'environnement*. 2000.
54. Morel F. M. M.; Hering J. G., *Principles and applications of aquatic chemistry (2nd ed.)*. John Wiley New York, 1993.
55. Murikami T.; Ise K.; Hayakawa M.; Kamei S.; Takagi S., Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron(III). *Chemistry Letters* **1989**, 2137-2140.
56. Aiken G. R.; McKnight D. M.; Wershaw R.L.; MacCarthy P., *Humic substances in soils, sediment and water*. Wiley-Interscience: New York, 1985.
57. Tipping E., *Cation Binding by Humic Substances*. Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 2002.

58. Milne C. J. Measurement and modelling of ion binding by humic substances. PhD thesis, The University of Reading, 2000.
59. Benedetti M. F.; Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Metal ion binding to humic substances: application of the non-ideal competitive adsorption model. *Environmental Science and Technology* **1995**, *29*, 446-457.
60. Benedetti M. F.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Kinniburgh D. G.; Gooddy D. C.; Milne C. J., Metal binding by natural organic matter: from the model to the field. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1996b**, *60*, 2503-2513.
61. Kinniburgh D. G.; Milne C. J.; Benedetti M. F.; Pinheiro J. P.; Filius J.; Koopal L. K.; Van Riemsdijk W. H., Metal ion binding by humic acid: Application of the NICA-Donnan model. *Environmental Science and Technology* **1996**, *30*, 1687-1698.
62. Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Borkovec M.; Benedetti M. F.; Avena M. J., Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and Surfaces* **1999**, *151*, 147-166.
63. Benedetti M. F.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Humic substances considered as a heterogeneous Donnan gel phase. *Environmental Science and Technology* **1996a**, *30*, 1805-1813.
64. Araujo G. C. L.; Lemos S. G.; Ferreira A. G.; Freitas H.; Nogueira A. R. A., Effect of pre-treatment and supporting media on Ni(II), Cu(II), Al(III) and Fe(III) sorption by plant root material. *Chemosphere* **2007**, *68*, 537-545.
65. Straczek A.; Sarret G.; Manceau G.; Hinsinger P.; Geoffroy N.; Jaillard B., Zinc distribution and speciation in roots of various genotypes of tobacco exposed to Zn. *Environmental and Experimental Botany* **2008**, *63*, 80-90.
66. Ginn B. R.; Szymanowski J. S.; Fein J. B., Metal and proton binding onto the roots of Fescue rubra. *Chemical Geology* **2008**, *253*, 130-155.
67. Marschner H.; Römhild V., Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* **1994**, *165*, 261-274.
68. Sancenon V.; Puig S.; Mira H.; Thiele D. J.; Penarrubia L., Identification of a copper transporter family in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **2003**, *51*, 577-587.
69. Sancenon V.; Puig S.; Mateu-Andrés I.; Dorcey E.; Thiele D. J.; Penarrubia L., The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (15), 15348-15355.
70. Puig S.; Andrès-Colas N.; Garcia-Molina A.; Penarrubia L., Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment* **2007**, *30*, 271-290.

71. Zheng S. J.; He Y. F.; Arakawa Y.; Masaoka Y.; Tang C., A copper-deficiency-induced root reductase is different from the iron-deficiency-induced one in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant and Soil* **2005**, 273, 69-76.
72. Wintz H.; Fox T.; Wu Y.-Y.; Feng V.; Chen W.; Chang H.-S.; Zhu T.; Vulpe C., Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 47644-47653.
73. Guerinot M. L., The ZIP family of metal transporters. *Biochimica and Biophysica Acta* **2000**, 1465, 190-198.
74. Grotz N.; Guerinot M. L., Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, 1763, 595-608.
75. Chen W. R.; Feng Y.; Chao Y. E., Genomic analysis and expression pattern of OsZIP1, OsZIP3 and OsZIP4 in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different zinc efficiency. *Russian Journal of Plant Physiology* **2008**, 55, 400-409.
76. Ishimaru Y.; Suzuki M.; Kobayashi T.; Takahashi M.; Nakanishi H.; Mori S.; Nishizawa N. K., OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *Journal of Experimental Biology* **2005**, 56, 3207-3214.
77. Ma J. F.; Nomoto K., Inhibition of mugeinic acid-ferric complex uptake in barley by copper, zinc and cobalt. *Physiologia Plantarum* **1993**, 89, 331-334.
78. Von Wirén N.; Marschner H.; Römheld V., Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc. *Plant Physiology* **1996**, 111, 1119-1125.
79. Schaaf G.; Ludewig U.; Erenoglu B.; Mori S.; Kitahara T.; Von Wirén N., ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 9091-9096.
80. Gries D.; Brunn S.; Crowley D.; Parker D. R., Phytosiderophore release in relation to micronutrient metal deficiencies in barley. *Plant and Soil* **1995**, 172, 299-308.
81. Degryse F.; Verma V. K.; Smolders E., Mobilization of Cu and Zn by root exudates of dicotyledonous plants in resin-buffered solutions and in soil. *Plant and Soil* **2008**, 306, 69-84.
82. Degryse F.; Smolders E.; Parker D. R., Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant and Soil* **2006**, 289, 171-185.
83. Weiss D. J.; Mason T. F. D.; Zhao F. J.; Kirk G. J. D.; Coles B. J.; Horstwood M. S. A., Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytologist* **2005**, 165, 703-710.
84. Rellán-Alvarez R.; Abadía J.; Anvárez-Fernández A., Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, 22, 1553-1562.

85. Pich A.; Scholz G., Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-simulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany* **1996**, 47 (294), 41-47.
86. Suzuki M.; Tsukamoto T.; Inoue H.; Watanabe S.; Matsushashi S.; Takahashi M.; Nakanishi H.; Mori S.; Nishizawa N. K., Deoxymugineic acid increases Zn translocation in Zn-deficient rice plants. *Plant Molecular Biology* **2008**, 66, 609-617.
87. Pesavento M.; Alberti G.; Biesuz R., Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Analytica Chimica Acta* **2009**, 631, 129-141.
88. van Leeuwen H. P.; Town R. M.; Buffle J.; Cleven R. F. M. J.; Davison W.; Puy J.; van Riemsdijk W. H.; Sigg L., Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environmental Science and Technology* **2005**, 39, 8545-8556.
89. Cancès B.; Ponthieu M.; Castrec-Rouelle M.; Aubry E.; Benedetti M. F., Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* **2003**, 113, 341-355.
90. Gleyzes C.; Tellier S.; Astruc M., Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *Trends in Analytical Chemistry* **2002**, 21, 451-467.
91. Sivry Y.; Riotte J.; Dupré B., Study of exchangeable metal on colloidal humic acids and particulate matter by coupling ultrafiltration and isotopic tracers: Application to natural waters. *Journal of Geochemical Exploration* **2006**, 88, 144-147.
92. Rodriguez-Gonzalez P.; Marchante-Gayon J. M.; Alonso J. I. G.; Sanz-Medel A., Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B* **2005**, 60, 151-207.
93. Han F. X.; Banin A.; Su Y.; Monts D. L.; Plodinec M. J.; Kingery W. L.; Triplett G. E., Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 497-504.
94. Fernandez-Calvino D.; Pateiro-Moure M.; Lopez-Periago E.; Arias-Estevez M.; Novoa-Munoz J. C., Copper distribution and acide-base mobilization in vineyard soils and sediments from Galicia (NW Spain). *European Journal of Soil Science* **2008**, 59, 315-326.
95. Novoa-Munoz J.; Queijeiro J. M. G.; Blanco-Ward D.; Alvarez-Olleros C.; Martinez-Cortizas A.; Garcia-Rodeja E., Total copper content and its distributions in acid-vineyard soils developed from granitic rocks. *Science of the Total Environment* **2007**, 378, 23-27.
96. Besnard E.; Chenu C.; Robert M., Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution* **2001**, 112, 329-337.

97. Agbenin J. O.; Olojo L. A., Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. *Geoderma* **2004**, *119*, 85-95.
98. Aldrich A. P.; Kistler D.; Sigg L., Speciation of Cu and Zn in drainage water from agricultural soils. *Environmental Science & Technology* **2002**, *36*, 4824-4830.
99. Karlsson T.; Persson P.; Skyllberg U., Complexation of copper(II) in organic soils and in dissolved organic matter - EXAFS evidence for chelate ring structures. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*, 2623-2628.
100. Flogeac K.; Guillon E.; Aplincourt M., Surface complexation of copper(II) on soil particles: EPR and XAFS studies. *Environmental Science and Technology* **2004**, *38*, 3098-3103.
101. Strawn D. G.; Baker L. L., Speciation of Cu in a contaminated agricultural soil measured by XAFS,  $\mu$ -XAFS, and  $\mu$ -XRF. *Environmental Science and Technology* **2008**, *42*, 37-42.
102. Boudesocque S.; Guillon E.; Aplincourt M.; Marceau E.; Stievano L., Sorption of Cu(II) onto vineyard soils: Macroscopic and spectroscopic investigations. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *307*, 40-49.
103. McBride M.; Sauvé S.; Hendershot W., Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science* **1997**, *48*, 337-346.
104. Romkens P. F. A.; Dolfing J., Effect of Ca on the solubility and molecular size distribution of DOC and Cu binding in soil solution samples. *Environmental Science and Technology* **1998**, *32*, 363-369.
105. Schramel O.; Michalke B.; Kettrup A., Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *The Science of the Total Environment* **2000**, *263*, 11-22.
106. Fernandez-Calvino D.; Rodriguez-Suarez J. A.; Lopez-Periago E.; Arias-Estevez M.; Simal-Gandara J., Copper contents of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distributions among soil or sediment components. *Geoderma* **2008**, *145*, 91-97.
107. Ginocchio R.; Sanchez P.; De la Fuente L. M.; Camus I.; Bustamante E.; Silva Y.; Urrestarazu P.; Torres J. C.; Rodriguez P. H., Agricultural soils spiked with copper mine wastes and copper concentrate: implications for copper bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2006**, *25*, 712-718.
108. Brun L. A.; Maillet J.; Richarte J.; Herrmann P.; Remy J. C., Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* **1998**, *102*, 151-161.
109. Chaignon V.; Sanchez-Neira I.; Herrmann P.; Jaillard B.; Hinsinger P., Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* **2003**, *123*, 229-238.

110. Michaud A. M.; Bravin M. N.; Galleguillos M.; Hinsinger P., Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant and Soil* **2007**, 298, 99-111.
111. Lee P-K.; Touray J-C.; Baillif P.; Ildefonse J-P., Heavy metal contamination of settling particles in a retention pond along the A-71 motorway in Sologne, France. *The Science of the Total Environment* **1997**, 201, 1-15.
112. Juillot F.; Morin G.; Ildefonse P.; Trainor T. P.; Benedetti M.; Galois L.; Brown Jr G. E., Occurrence of Zn/Al hydrotalcite in smelter-impacted soils from northern France: Evidence for EXAFS spectroscopy and chemical extractions. *American Mineralogist* **2003**, 88, 509-526.
113. Stephan C. H.; Courchesne F.; Hendershot W. H.; McGrath S. P.; Chaudri A. M.; Sappin-Didier V.; Sauvé S., Speciation of zinc in contaminated soils. *Environmental Pollution* **2008**, 155, 208-216.
114. Graham S.; Pearson N.; Jackson S.; Griffin W.; O'Reilly S. Y., Tracing Cu and Fe from source to porphyry: in situ determination of Cu and Fe isotope ratios in sulfides from the Grasberg Cu-Au deposit. *Chemical Geology* **2004**, 207, 147-169.
115. Larson P. B.; Maher K.; Ramos F. C.; Chang Z.; Gaspar M.; Meinert L. D., Copper isotope ratios in magmatic and hydrothermal ore-forming environments. *Chemical Geology* **2003**, 201, 337-350.
116. Asael D.; Matthews A.; Bar-Matthews M.; Halicz L., Copper isotope fractionation in sedimentary copper mineralization (Timna Valley, Israel). *Chemical Geology* **2007**, 243, 238-254.
117. Maher K. C.; Larson P. B., Variation in copper isotope ratios and controls on fractionation in hypogene skarn mineralization at Corocohuayco and Tintaya, Peru. *Economic Geology* **2007**, 102, 225-237.
118. Maréchal C. N.; Télouk P.; Albarède F., Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* **1999**, 156, 251-273.
119. Markl G.; Lahaye Y.; Schwinn G., Copper isotopes as monitors of redox processes in hydrothermal mineralization. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, 70, 4215-4228.
120. Mathur R.; Ruiz J.; Titley S.; Liermann L.; Buss H.; Brantley S., Cu isotopic fractionation in the supergene environment with and without bacteria. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2005**, 69, 5233-5246.
121. Zhu X. K.; O'Nions R. K.; Guo Y.; Belshaw N. S.; Rickard D., Determination of natural Cu-isotope variation by plasma-source mass spectrometry: implications for use as geochemical tracers. *Chemical Geology* **2000**, 163, 139-149.
122. Chapman J. B.; Mason T. F. D.; Weiss D. J.; Coles B. J.; Wilkinson J. J., Chemical separation and isotopic variations of Cu and Zn from five geological reference materials. *Geostandards and Geoanalytical research* **2005**, 30, 5-16.

123. Kimball B. E.; Mathur R.; Dohnalkova A. C.; Wall A. J.; Runkel R. L.; Brantley S. L., Copper isotope fractionation in acid mine drainage. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**.
124. Mason T. F. D.; Weiss D. J.; Chapman J. B.; Wilkinson J. J.; Tessalina S. G.; Spiro B.; Horstwood M. S. A.; Spratt J.; Coles B. J., Zn and Cu isotopic variability in the Alexandrinka volcanic-hosted massive sulphide (VHMS) ore deposit, Urals, Russia. *Chemical Geology* **2005**, 221, 170-187.
125. Rouxel O.; Fouquet Y.; Ludden J. N., Copper isotopes systematics of the Lucky Strike, Rainbow, and Logatchev sea-floor hydrothermal fields on the mid-atlantic ridge. *Economic Geology* **2004**, 99, 585-600.
126. Moynier F.; Albarède F.; Herzog G. F., Isotopic compositions of zinc, copper, and iron in lunar samples. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, 70, 6103-6117.
127. Luck J. M.; Ben Othman D.; Albarède F., Zn and Cu isotopic variations in chondrites and iron meteorites: Early solar nebula reservoirs and parent-body processes. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2005**, 69, 5351-5363.
128. Luck J. M.; Ben Othman D.; Barrat J. A., Coupled  $^{63}\text{Cu}$  and  $^{16}\text{O}$  excesses in chondrites. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2003**, 67, 143-151.
129. Archer C.; Vance D., Mass discrimination correction in multiple-collector plasma source mass spectrometry: an example using Cu and Zn isotopes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19 (656-665).
130. Ben Othman D.; Luck J. M.; Bodinier J. L.; Arndt N. T.; Albarède F., Cu-Zn isotopic variations in the Earth's mantle. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, 70, A46.
131. Borrok D. M.; Nimick D. A.; Wanty R. B.; Ridley W. I., Isotopic variations of dissolved copper and zinc in stream waters affected by historical mining. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72 (2), 329-344.
132. Li W.; Jackson S. E.; Pearson N. J.; Alard O.; Chappell B. W., The Cu isotopic signature of granites from the Lachlan Fold Belt, SE Australia. *Chemical Geology* **2008**.
133. Maréchal C. N. Géochimie des isotopes du cuivre et du zinc : méthode, variabilité naturelle et application océanographique. Université Joseph Fournier - Grenoble 1, Grenoble, 1998.
134. Vance D.; Archer C.; Bermin J.; Perkins J.; Statham P. J.; Lohan M. C.; Ellwood M. J.; Mills R. A., The copper isotope geochemistry of rivers and the oceans. *Earth and Planetary Science Letters* **2008**, 274, 204-213.
135. Zhu Z. K.; Guo Y.; Williams R. J. P.; O'Nions R.K.; Matthews A.; Belshaw N. S.; Canters G. W.; de Waal E. C.; Weser U.; Burgess B. K.; Salvato B., Mass fractionation processes of transition metal isotopes. *Earth and Planetary Science Letters* **2002**, 200, 47-62.

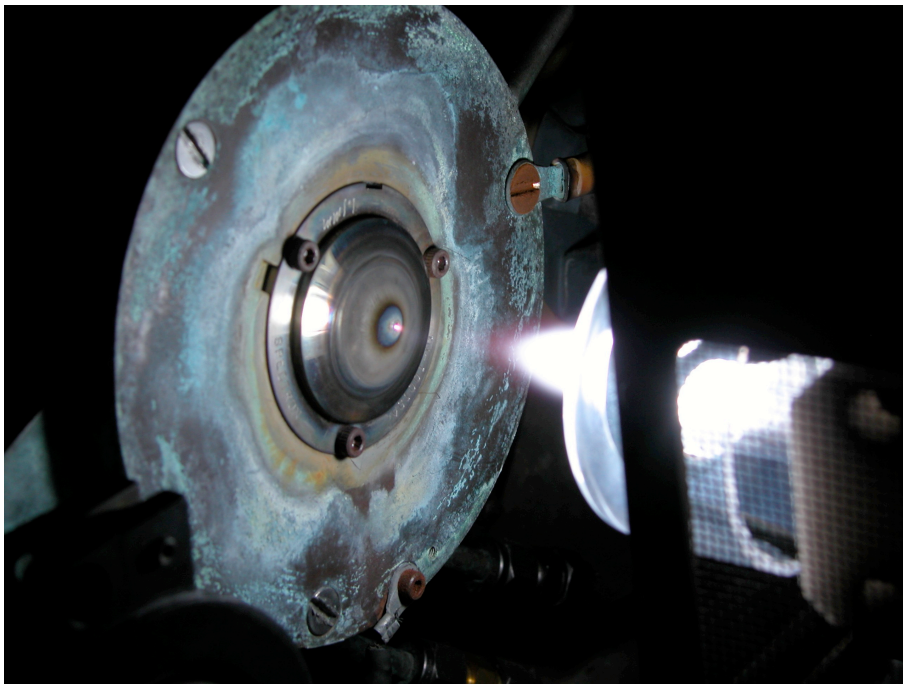
136. Maréchal C. N. Géochimie des isotopes du cuivre et du zinc : méthode, variabilité naturelle et application océanographique. Ecole Normale Supérieure, Lyon, 1998.
137. Chen J.; Louvat P.; Gaillardet J.; Birck J-L., Direct separation of Zn from dilute aqueous solutions for isotope composition determination using multi-collector ICP-MS. *Chemical Geology* **2008**, *In press*.
138. Bermin J.; Vance D.; Archer C.; Statham P. J., The determination of the isotopic composition of Cu and Zn in seawater. *Chemical Geology* **2005**, *226*, 280-297.
139. Chen J.; Gaillardet J.; Louvat P., Multi-isotopic (Zn, Cu) approach for anthropogenic contamination of suspended sediments of the Seine River, France. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *71 suppl 1*, A155.
140. Mason T. F. D.; Weiss D.; Horstwood M.; Parrish R. R.; Russell S. S.; Mullane E.; Coles B. J., High-precision Cu and Zn isotope analysis by plasma source mass spectrometry. Part 2. Correcting for mass discrimination effects. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 218-226.
141. Ehrlich S.; Butler I.; Halicz L.; Rickard D.; Oldroyd A.; Matthews A., Experimental study of the copper isotope fractionation between aqueous Cu(II) and covellit, CuS. *Chemical Geology* **2004**, *209*, 259-269.
142. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Emnova E. E.; Kompantseva E. I.; Freydier R., Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hyd)oxides: Possible structural control. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *72*, 1742-1757.
143. Balistrieri L. S.; Borrok D. M.; Wanty R. B.; Ridley W. I., Fractionation of Cu and Zn isotopes during adsorption onto amorphous Fe(III) oxyhydroxide: Experimental mixing of acid rock drainage and ambient river water. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *72*, 311-328.
144. Cloquet C.; Carignan J.; Lehmann M. F.; Vanhaecke F., Variation in the isotopic composition of zinc in the natural environment and the use of zinc isotopes in biogeosciences: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 451-463.
145. Sivry Y.; Riotte J.; Sonke J. E.; Audry S.; Schäfer J.; Viers J.; Blanc G.; Freydier R.; Dupré B., Zn isotopes as tracers of anthropogenic pollution from Zn-ore smelters : The Riou Mort-Lot River system. *Chemical Geology* **2008**, *255*, 295-304.
146. Sonke J. E.; Sivry Y.; Viers J.; Freydier R.; Dejonghe L.; André L.; Aggarwal J. K.; Fontan F., Historical variations in the isotopic composition of atmospheric zinc deposition from a zinc smelter. *Chemical Geology* **2008**, *252*, 145-157.
147. Dolgoplova A.; Weiss D. J.; Seltnann R.; Kober B.; Mason T. F. D.; Coles B.; Stanley C. J., Use of isotope ratios to assess sources of Pb and Zn dispersed in the environment during mining and ore processing within the Orlovka-Spokoinoe mining site (Russia). *Applied Geochemistry* **2006**, *21*, 563-579.



148. Weiss D. J.; Rausch N.; Mason F. D.; Coles B. J.; Wilkinson J. J.; Ukonmaanaho L.; Arnold T.; Nieminen T. M., Atmospheric deposition and isotope biogeochemistry of zinc in ombrotrophic peat. *Geochimica Cosmochimica Acta* **2007**, 71 (14), 3498-3517.
149. Chen J.; Gaillardet J.; Louvat P., Zn isotopes in the suspended load of the Seine River, France: Isotopic variations and source determination. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2009**, *In revision*.
150. Viers J.; Oliva P.; Nonell A.; Gélabert A.; Sonke J. E.; Freydier R.; Gainville R.; Dupré B., Evidence of Zn isotopic fractionation in a soil-plant system of a pristine tropical watershed (Nsimi, Cameroon). *Chemical Geology* **2007**, 239, 124-137.
151. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Freydier R., Zinc stable isotope fractionation during its adsorption on oxides and hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 291, 192-200.
152. Juillot F.; Maréchal C.; Ponthieu M.; Cacaly S.; Morin G.; Benedetti M.; Hazemann J.L.; Proux O.; Guyot F., Zn isotopic fractionation caused by sorption on goethite and 2-Lines ferrihydrite. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 4886-4900.
153. Gélabert A.; Pokrovsky O. S.; Viers J.; Schott J.; Boudou A.; Feurtet-Mazel A., Interaction between zinc and freshwater and marine diatom species : Surface complexation and Zn isotope fractionation. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, 70, 839-857.
154. John S. G.; Geis R. W.; Saito M. A.; Boyle E. A., Zinc isotope fractionation during high-affinity and low-affinity zinc transport by the marine diatom *Thalassiosira oceanica*. *Limnology and Oceanography* **2007**, 52, 2710-2714.
155. Moynier F.; Pichat S.; Pons M-L.; Fike D.; Balter V.; Albarède F., Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chemical Geology* **2008**.

## **Chapitre II**

### Outils expérimentaux, analytiques et modélisation





## Chapitre II

### Outils expérimentaux, analytiques et modélisation

#### 1. Introduction

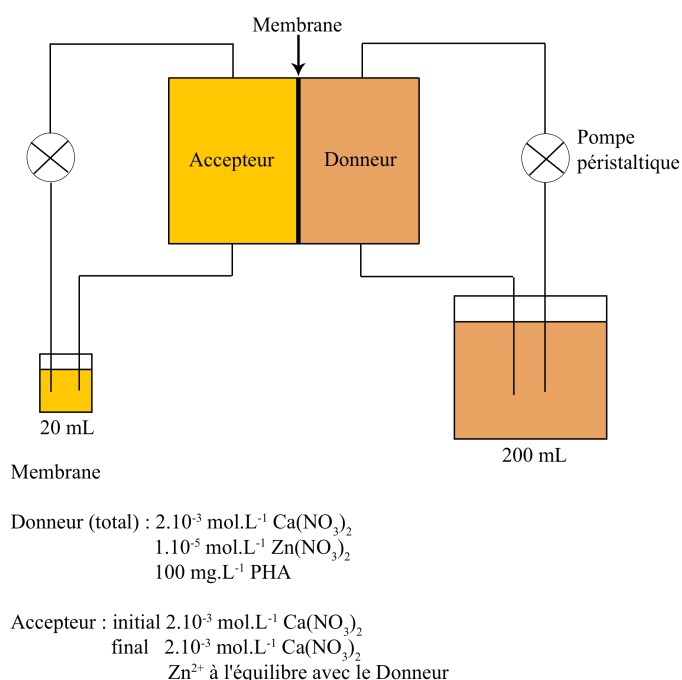
La géochimie expérimentale, et en particulier la géochimie isotopique, nécessite l'utilisation de protocoles adaptés et une pratique rigoureuse des instruments de mesure. Dans ce chapitre seront exposés les différents outils qui ont permis l'obtention de données au cours de cette thèse. Dans une première partie, les montages expérimentaux et en particulier la technique de la Donnan Membrane sont détaillés. Ensuite, sont explicitées les mesures de concentration élémentaire réalisées. Afin de bien valider les données de rapports isotopiques de cuivre et zinc obtenues pendant cette thèse, les mesures isotopiques avec les purifications chimiques préalables seront bien détaillées et notamment, le fonctionnement du MC-ICP-MS, la correction de discrimination de masse et les diverses observations lors des sessions de mesure. Nous finirons par un aperçu des modèles utilisés lors de cette étude. Ils permettent de décrire le fonctionnement, au moins partiel, des objets géochimiques auxquels nous nous sommes intéressés : la matière organique, les plantes et les sols.

#### 2. Montage Expérimental

##### 2.1. Donnan Membrane

La technique DM (Donnan Membrane) a été développée à l'université de Wageningen par Temminghoff et al.<sup>1</sup>. La DM a le grand avantage de permettre la mesure des ions libres en solution sans perturber l'équilibre dans la solution à étudier, contrairement à d'autres techniques comme les DGT (Diffusive Gradients in Thin films). Le schéma de la DM est représenté dans la **Figure 11**. La DM consiste donc en une cellule séparée en deux

compartiments par une membrane. La membrane est composée d'une matrice de polystyrène et de divinylbenzène avec des groupements sulfoniques ( $\text{HSO}_2\text{OH}$ ) à sa surface. Les groupements sulfoniques sont complètement déprotonés pour un pH supérieur à 2. La membrane sera chargée négativement dans nos conditions expérimentales et ne laissera donc passer que les ions positifs. Elle est d'une épaisseur de 0,16 mm et la surface en contact avec la solution est de  $7\text{ cm}^2$ . Dans le compartiment donneur, est placée la solution dont la spéciation est à mesurer et dans le compartiment accepteur, uniquement une solution électrolyte ayant les mêmes ions majeurs et la même force ionique que la solution étudiée. La membrane permettant le passage des cations, un équilibre cationique de Donnan va s'établir entre le côté donneur et le côté accepteur.

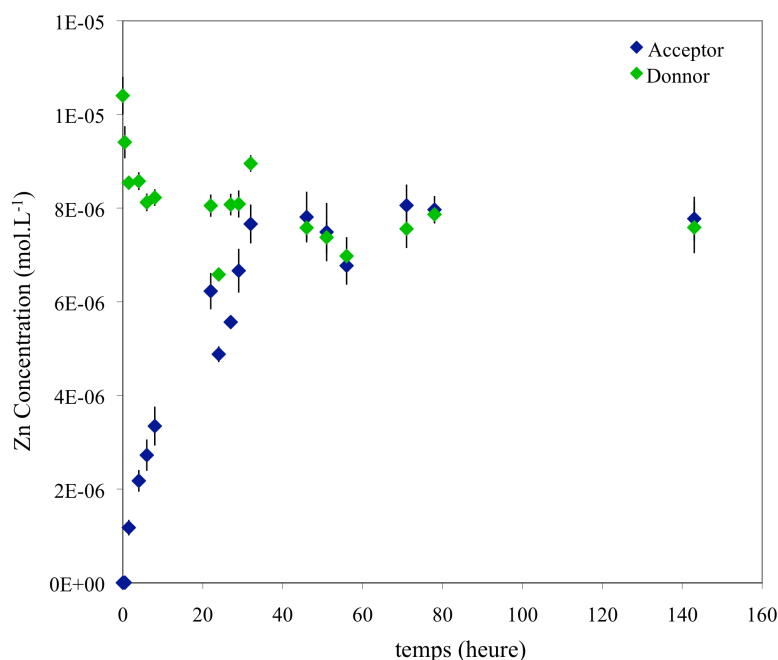


**Figure 11** : Schéma de la DM

Le volume est très différent pour les deux compartiments, 20 mL du côté accepteur et 200 mL du côté donneur. Cette différence est nécessaire afin d'assurer que l'équilibre de Donnan entre côté donneur et côté accepteur n'affectera pas la spéciation du côté donneur.

L'évolution de la concentration des éléments dans le côté accepteur au cours du temps dépend de la charge des ions et de la force ionique de la solution<sup>1, 2</sup>. Un équilibre s'établira autour de 2 jours pour la plupart des métaux divalents (Temminghoff et al.<sup>1</sup>, Weng et al.<sup>2, 3</sup>, Oste et al.<sup>4</sup>, Cancès et al.<sup>5</sup>), mais est beaucoup plus longs pour les cations trivalents<sup>6</sup>. Cet équilibre entre

côté accepteur et côté donneur est observable pour le zinc dans la **Figure 12**. Côté donneur, la concentration en zinc décroît dans les 4 premières heures avant de se stabiliser. Cette décroissance a déjà été observée<sup>2, 4</sup> et est associée à de la complexation du zinc sur la membrane.



**Figure 12:** Evolution des concentrations au cours du temps dans les deux côtés de la DM

Lors de l'expérience avec un montage de la DM, plusieurs équilibres ont lieu : i) un équilibre de Donnan entre côtés accepteur et donneur (équilibration de la concentration en cations de chaque côté de la membrane), ii) un équilibre chimique entre le zinc libre et le zinc complexé avec la matière organique du côté accepteur et iii) un équilibre isotopique entre toutes les espèces (zinc libre, zinc complexé sur la matière organique, zinc complexé sur la membrane et éventuellement zinc du côté accepteur). Il est donc nécessaire d'estimer le plus long temps d'équilibre pour l'obtention de données correctes. Comme on peut le voir sur la **Figure 12**, la complexation sur la membrane se fait en l'espace de quelques heures et l'équilibre entre donneur et accepteur après 3 jours. Concernant l'équilibre entre les métaux et l'acide humique, l'étude de Ma et al.<sup>7</sup> sur le cuivre a montré que la majeure partie de la complexation avait lieu en quelques minutes et qu'une complexation plus lente avait encore lieu lors des 24 heures suivantes. Aucune étude n'a été réalisée pour le zinc, mais il est très probable que le

temps d'équilibration soit similaire à ceux du cuivre, c'est-à-dire largement inférieur au temps d'équilibre de Donnan entre côté accepteur et côté donneur.

Pour l'équilibre isotopique, aucune mesure n'a été réalisée pour confirmer qu'il a bien été atteint. Cependant, Juillot et al.<sup>8</sup>, qui ont procédé à des expériences d'adsorption du zinc sur de la goethite et de la ferrihydrite, ont observé que l'évolution temporelle des rapports isotopiques suivait l'évolution temporelle du taux de complexation suggérant un équilibre isotopique beaucoup plus rapide que l'équilibre chimique. Sivry et al.<sup>9</sup> ont étudié l'échange isotopique de plusieurs éléments entre solution et acide humique et ont démontré que 90% de l'échange isotopique a lieu dans les quelques minutes qui suivent l'ajout de spike. À l'instar de nombreuses autres études<sup>8, 10-12</sup>, nous considérerons donc que le temps d'équilibration isotopique ne sera pas limitant pour les mesures de cette étude.

### *2.1.1. Adaptation de la DM pour les mesures isotopiques*

Tout d'abord, la membrane complexant le zinc lors des expériences de DM, il a été nécessaire de vérifier son influence sur les rapports isotopiques mesurés. Une première série d'expériences sur les membranes seules ont été effectuées. Puis une autre série avec l'ensemble de la DM mais sans acide humique a été réalisée. Les résultats associés à ces expériences sont détaillés dans le Chapitre 3 et valident l'utilisation de la DM pour des mesures isotopiques.

Après les tests sur les membranes, la principale difficulté expérimentale liée à la DM a été le grand risque de contamination en zinc du système. En effet, pour empêcher toute fuite du côté accepteur par le côté donneur, l'ensemble du système est contenu par des vis en métal et des joints en plastique. Ces vis contiennent principalement du fer mais aussi une quantité non négligeable de zinc. Ceci a été découvert lors de tests pour comprendre les niveaux un peu trop élevés de zinc dans les solutions de lavage des membranes. Le bilan global en concentration du zinc sur l'ensemble du système (accepteur + donneur + membrane) était supérieur au zinc ajouté lors des expériences. Pour résoudre ce problème, les lavages de l'ensemble du système DM ont été intensifiés, en particulier la concentration en acide et le nombre de lavages ont été augmentés. De plus, pour les dernières expériences, des vis en acier inoxydable ont remplacé les anciennes vis.

Les concentrations en cuivre et en zinc des différentes solutions utilisées lors de la préparation des montages de la DM ainsi que dans les lavages des composants de la DM sont présentées dans le Tableau 7. Pour comparaison, la concentration en zinc dans la solution donneur se situe autour de 700 ppb. Tout d'abord, sont présentées les solutions utilisées lors des lavages, de la fixation du pH et composant les électrolytes. Les concentrations dans ces solutions restent faibles et négligeables face au zinc ajouté pour nos expériences.

Ensuite, les concentrations associées aux séquences de lavage des membranes avant et après l'expérience sont données pour une membrane. Les membranes sont lavées trois fois à l'acide nitrique 1 M, lavages entrecoupés de rinçages à l'eau milliQ. La séquence de lavage des membranes avant l'expérience est efficace pour éliminer toute trace de cuivre ou de zinc. Après chaque expérience, la membrane est récupérée et lavée à l'acide chlorhydrique 2 M trois fois.

Le premier lavage est donc forcément très enrichi en zinc. Cependant, au bout du troisième lavage, même étant faible, la concentration en zinc reste plus élevée qu'à la fin du lavage pré-expérimentation. L'ensemble des composants du système (éléments en plastiques de la DM et petits connecteurs en polypropylène) sont lavés en deux étapes, la première à l'HCl 2 M et la seconde avec de l'HNO<sub>3</sub> 1 M puis sont conditionnés dans du Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2.10<sup>-3</sup> M. De même que pour les membranes, le premier lavage a une concentration en zinc relativement élevée mais ensuite, les concentrations en zinc baissent et sont satisfaisantes pour nos expériences.

Pour finir, les vis qui maintiennent les systèmes de DM en place ont été mises dans une solution de 50 mL de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2.10<sup>-3</sup> M pendant trois jours. Ces conditions sont très différentes de celles ayant lieu dans la DM où la surface de contact entre la vis et la solution de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> est très faible. Néanmoins, la concentration en zinc dans la solution en contact avec la vis est très élevée et montre le grand risque de contamination des expériences en zinc. Cependant, des expériences menées sans matière organique mais avec du zinc (Chapitre 3) ne montre aucun rapport isotopique exotique dans les différents compartiments et surtout aucun fractionnement entre le côté accepteur et le côté donneur.



Concentration (ppb)		Cu	Zn
Solutions utilisées dans les expériences de DM	PHA (100 mg.L <sup>-1</sup> )	0,95	2,60
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 2.10 <sup>-3</sup>	<0,05	0,35
	HNO <sub>3</sub> 0,05N	<0,05	<0,05
	HNO <sub>3</sub> 3%	<0,05	0,08
	HNO <sub>3</sub> 65%	<0,05	1,05
	KOH 1N	0,79	1,81
Lavage de la membrane avant l'expérience et conditionnement	Lav_Mb_H <sub>2</sub> O_1	0,07	0,17
	Lav_Mb_HNO <sub>3</sub> _1	30,51	36,34
	Lav_Mb_H <sub>2</sub> O_2	0,20	0,15
	Lav_Mb_HNO <sub>3</sub> _2	1,31	1,86
	Lav_Mb_H <sub>2</sub> O_3	0,14	0,10
	Lav_Mb_HNO <sub>3</sub> _3	0,00	0,14
	Lav_Mb_H <sub>2</sub> O_4	0,13	0,13
	Mb_Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 2.10 <sup>-3</sup>	5,43	1,26
Lavage de la membrane après l'expérience	Lav_Mb_HCl_1	26,48	579,77
	Lav_Mb_HCl_2	<0,05	40,00
	Lav_Mb_HCl_3	<0,05	8,41
Lavage du système DMT et des petits connecteurs	Lav_DMT_HCl	0,29	50,29
	Lav_DMT_HNO <sub>3</sub>	0,15	5,10
	Lav_DMT_Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,14	2,25
	Lav_connect_Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,47	0,61
Test de « dissolution » des vis	Vis_Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,51	4.028,98
	Vis-inox_Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,40	3,16

**Tableau 7:** Concentration en cuivre et en zinc des différentes solutions utilisées dans le montage de la DM ainsi que lors des lavages des différents composants.

Pour améliorer le système, des vis en acier inoxydable ont été testées et montrent une contamination en zinc beaucoup plus faible. Ces vis en acier ont été utilisées pour les dernières expériences. Des vis en téflon seraient aussi une solution satisfaisante. Il est toutefois notable que cette contamination de la membrane n'affecte pas les mesures en isotopie dans les côtés accepteurs et donneurs (voir expériences sans PHA dans le Chapitre 3).

### *2.1.2. Utilisation pour les mesures de solutions du sol*

La DM, avec une adaptation simple (Soil Column-Donnan Membrane), permet de mesurer les concentrations des éléments dissous en équilibre avec le sol dans une solution du sol reconstitué (Weng et al.<sup>2</sup>, Cancès et al.<sup>5</sup>). L'adaptation consiste à ajouter un réservoir contenant du sol connecté au reste du système du côté donneur. Le volume de sol est de 8 g et la solution électrolytique ( $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$ ) de 40 mL du côté de donneur. De la même manière que pour les expériences avec l'acide humique, le côté accepteur contient 20 mL de solution électrolyte. Lors de l'utilisation de la DM sur des sols, le compartiment sol était isolé du reste du système par des petites grilles en plastique servant de filtres. Malgré ces grilles, des petits éléments de sols se retrouvaient fréquemment dans les tuyaux et s'ils s'aggloméraient, provoquaient une fuite à cause d'une trop forte pression.

La mesure de la solution du sol et des cations libres par la SC-DM nous donne des informations précieuses sur la spéciation des éléments étudiés. La mesure de la solution de sol reconstituée peut être mise en regard d'autres mesures comme l'échantillonnage rhizon, qui prélève la vraie solution du sol, ou le montage DGT, qui prend en compte aussi les espèces labiles. La mesure du métal libre par SC-DM peut aussi permettre de caler des modèles pour obtenir la spéciation complète du métal dans la solution du sol.

## **2.2. Plantes**

Les protocoles expérimentaux utilisés lors d'expériences avec les plantes n'ont pas demandé de développements de notre part et seront donc décrits plus en détails dans les chapitres correspondants (Chapitre 4 et Chapitre 5). Dans les expériences du Chapitre 4, il s'agissait de faire pousser des plants de blé et de tomate en hydroponie dans le phytotron de l'INRA de Montpellier en collaboration avec Matthieu Bravin et Philippe Hinsinger (UMR Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère). Ceci a été réalisé afin de mesurer le fractionnement isotopique du cuivre et du zinc associé au prélèvement par les plantes en fonction de leur stratégie de prélèvement du fer. Dans le Chapitre 5, des plants de blé ont été cultivés sur des sols contaminés en cuivre sous serre à l'INRA, Bordeaux, en collaboration

avec Yohann Soulacroix, André Schneider et Laurence Denaix (UMR Transfert sol plante Cycle des Eléments minéraux dans les écosystèmes cultivés).

### **3. Mesures de concentration**

#### **3.1. Spectrométrie d’Absorption Atomique Flamme**

Dans la spectrométrie d’absorption atomique flamme, l’échantillon à mesurer est sous forme liquide, puis est transformé en aérosol et mélangé avec un gaz combustible (dans notre cas air et acétylène). Ce mélange est allumé en une « flamme » dont la température varie de 2100 à 2800°C. Dans ces conditions, les atomes des espèces contenues dans l’échantillon sont dans leur état fondamental et vont absorber la lumière à des longueurs d’onde caractéristiques. Une lampe dont la cathode est formée de l’élément à mesurer envoie un rayon lumineux à la longueur d’onde caractéristique à travers la flamme. Un multiplicateur de photons mesure ensuite la réduction d’intensité lumineuse due à l’absorption par l’échantillon et celle-ci peut être directement liée à la quantité de l’élément considéré dans l’échantillon.

La spectrométrie d’absorption Atomique Flamme utilisée au laboratoire est un modèle Solaar Unicam et a servi à mesurer dans le cadre de cette étude : le calcium, le cuivre et le zinc. Les limites de détection sont de  $10^{-6}$  M,  $5.10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M respectivement pour ces trois éléments et la précision sur les mesures de concentration est de 1%.

#### **3.2. Dosage de carbone organique (Total Organic Carbon Analyser)**

Pour les expériences comportant de la matière organique, la concentration en carbone organique a été mesurée sous forme de NPOC (Non Purgeable Organic Carbon) grâce à un TOC-VCSH de Shimadzu. Pour mesurer le NPOC, une petite quantité (25 µL) d’acide chlorhydrique 2 M est ajoutée dans la machine à l’échantillon pour transformer le carbone inorganique (i.e. carbonates, bicarbonates...) en CO<sub>2</sub>. L’échantillon est ensuite purgé de ce CO<sub>2</sub> grâce au bullage du gaz porteur. Une fois purgé, l’échantillon liquide est injecté dans le four à 680°C où tout le carbone organique est oxydé en CO<sub>2</sub>. Il passe ensuite dans le

déshumidificateur pour retirer l'eau et dans l'épurateur d'halogènes pour finalement être détecté par infrarouges (Non Dispersive Infra Red detector).

Les échantillons ont été mesurés avec une dilution 10 (concentration finale en carbone de l'ordre de  $5\text{mg.L}^{-1}$ ) et préalablement acidifiés pour une meilleure conservation. Habituellement, deux standards sont passés en début de séquence pour contrôler la calibration ainsi que cinq blancs. D'autres blancs sont passés en cours et en fin de séquence. Les blancs ont une concentration en carbone total de maximum  $0,3\text{ mg.L}^{-1}$  et typiquement de  $0,1\text{ mg.L}^{-1}$ . L'écart-type associé aux mesures des échantillons et standards est à moins de 1%.

### **3.3. Spectrométrie de masse pour la mesure de concentrations en éléments traces**

L'ICP-MS X-series II de Thermo Scientific utilisé pour la mesure de la concentration totale en cuivre et en zinc comprend une source plasma, un quadrupôle comme analyseur et un seul collecteur (un multiplicateur d'électrons). Cet appareil a été utilisé pour les mesures de blancs ou d'échantillons peu concentrés. Il permet la mesure d'éléments traces jusqu'à de très faibles concentrations (pour le cuivre et le zinc, la limite de détection se situe autour de 50 ppt) mais n'a pas une assez bonne résolution pour mesurer de manière fiable les rapports isotopiques de ces mêmes éléments.

Après optimisation du signal (stabilité et sensibilité), l'appareil est calibré en début de séance par une série de standards de concentrations comprises entre 0,05 et 10 ppb, qui est repassé tous les 20 échantillons. La stabilité de l'appareil et les effets de matrice sont vérifiés par le passage régulier d'un standard international (ici le SLRS 4) tous les 10 échantillons et, éventuellement, par l'ajout d'un standard interne d'indium. Les standards et échantillons dilués ont été préparés avec une solution d'acide nitrique 0,05 M tandis que les échantillons peu concentrés étaient analysés directement après acidification à 0,05 M par ajout d'acide nitrique concentré (16 M).

Les blancs machine mesurés en début de session sont de l'ordre de 10 ppt mais, dans le cas du zinc, peuvent augmenter jusqu'à 50 ppt en fin de session. Le lavage en début de session (pendant la stabilisation de l'appareil) et entre les standards est assuré par une solution d'acide nitrique 0,5M. Un long temps de lavage peut en effet être nécessaire en début de session à cause d'effets mémoire des sessions précédentes. En particulier, de nombreux effets

de mémoire du  $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ar}$  sur la masse du  $^{63}\text{Cu}$  ont pu être observés, suite au passage par les utilisateurs précédents de solutions riches en sodium.

## 4. Mesure des rapports isotopiques du cuivre et du zinc

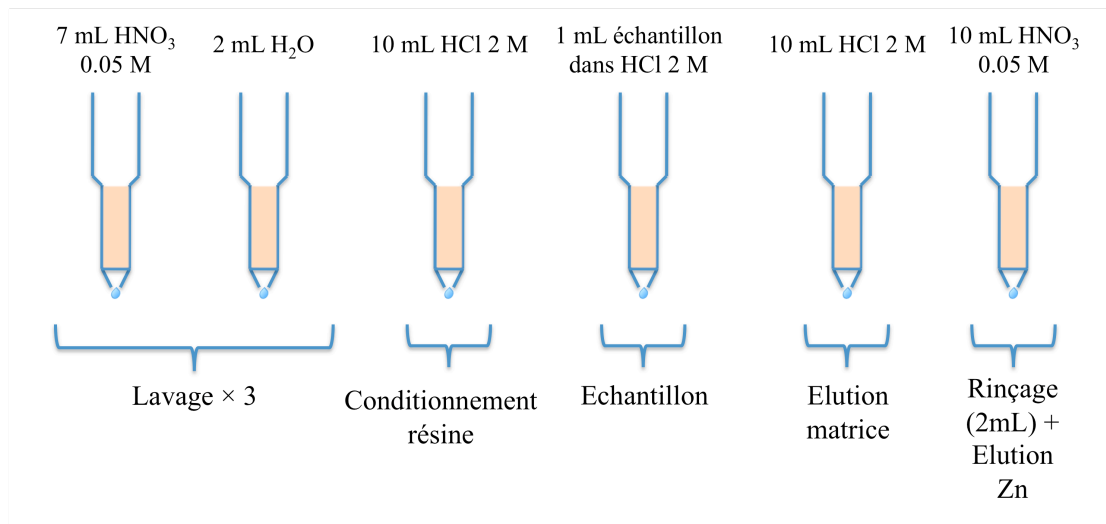
### 4.1. Purification chimique

Avant toute mesure sur l'ICP-MS multicollecteur (MC-ICP-MS), le zinc et le cuivre des échantillons doivent être séparés l'un de l'autre mais aussi des autres éléments présents dans l'échantillon pour limiter les interférences et les effets de matrice lors de la mesure. Deux types d'échantillons ont été traités sur colonnes au cours de cette étude : des échantillons provenant d'expériences abiotiques (zinc et matière organique) où seul le zinc fut étudié, et des échantillons venant d'expériences avec des plantes où cuivre et zinc furent étudiés.

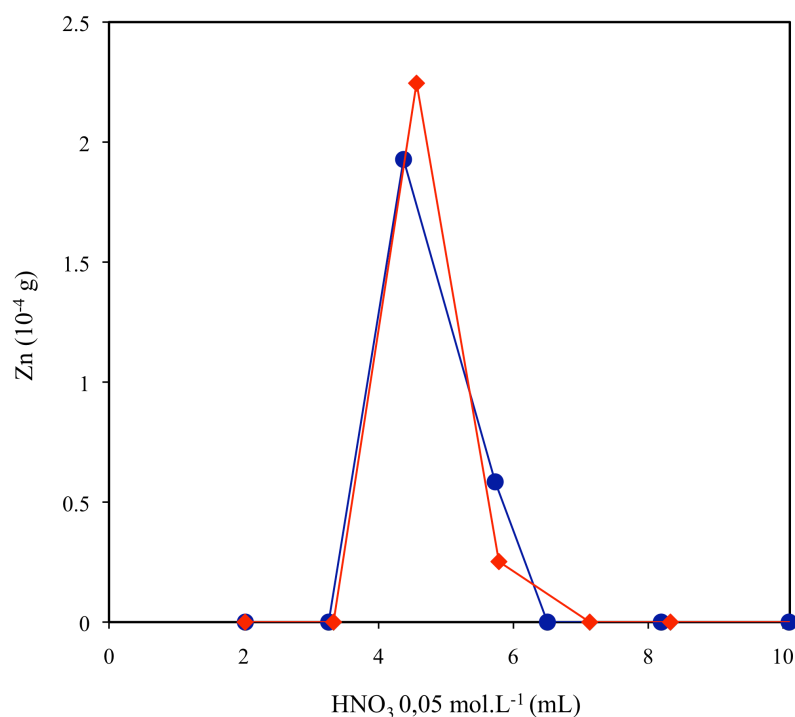
Pour éliminer la matière organique des échantillons, diverses techniques ont été mises en place. Tout d'abord, pour les expériences abiotiques, les échantillons ont subi une attaque UV. Malgré l'utilisation du digesteur UV, il restait couramment des agrégats de matière organique en suspension dans la solution. Les échantillons étaient donc ensuite attaqués à l'acide nitrique 16M à chaud ( $\sim 120^\circ\text{C}$ ) pendant une nuit jusqu'à l'obtention d'une solution transparente. Pour les échantillons de plantes (Chapitre 4 et 5), ceux-ci ont été attaqués à l'acide nitrique 16 M dans un four à micro-onde Milestone Ethos Touch Control durant trente minutes à une température de  $180^\circ\text{C}$  et une pression de  $2 \cdot 10^6$  Pa (20 bars).

Dans le cadre des expériences abiotiques d'interactions entre le zinc et la matière organique, le protocole de purification utilisé est simplifié par rapport à celui de Maréchal et al.<sup>13</sup>. En effet, puisque seule la mesure isotopique du zinc nous intéresse, il n'est pas nécessaire de séparer le cuivre et le fer qui peuvent donc sortir dans la même fraction que la matrice. Pour la séparation du zinc, nous utilisons une résine échangeuse d'anions AG MP 1 (1,6 mL de résine, Biorad 200-400 mesh) montée sur colonnes (Biorad Poly-prep columns, 0,8 cm  $\varnothing$   $\times$  4 cm de long avec un réservoir de 10 mL). Cette résine étant assez fragile, avant tout usage, il est nécessaire de retirer tous les grains abîmés ou de taille inférieure à la moyenne. Pour cela, la résine est mise en suspension dans l'eau une dizaine de fois et le surnageant, qui contient la résine défectueuse est jetée. Ensuite, la résine est nettoyée deux fois à l'acide nitrique 1 M

avant d'être installée sur la colonne. La **Figure 13** représente les différentes étapes du protocole d'élution du zinc et la **Figure 14** illustre le pic d'élution du zinc sur les 10 derniers millilitres.



**Figure 13:** Protocole d'élution du zinc selon le protocole adapté de Maréchal et al.<sup>13</sup>



**Figure 14:** Elution du zinc à partir d'un standard de zinc avec le protocole de Maréchal et al.<sup>13</sup>

Pour les expériences nécessitant la séparation du cuivre, du zinc et de la matrice, les protocoles de Maréchal et al.<sup>13</sup> et de Borrok et al.(2008)<sup>14</sup> ont été utilisés. Borrok et

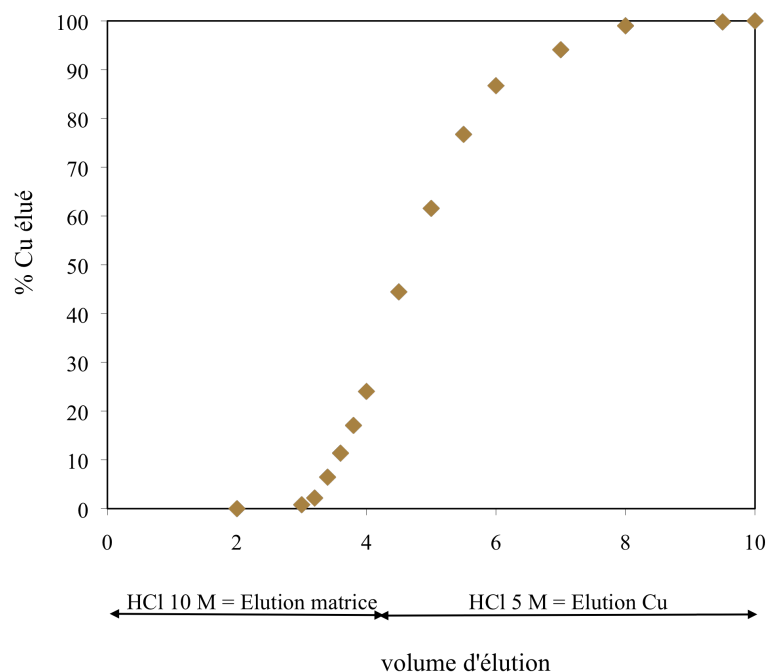
al.(2007)<sup>15</sup> ont proposé un protocole précédant d'un an celui de Borrok et al.(2008)<sup>14</sup> avec pour principale différence le volume de résine utilisé. Il sera démontré par la suite que c'est de grande importance. Le protocole de Maréchal a l'inconvénient de ne pas parfaitement séparer le cuivre et le zinc du reste de la matrice, en particulier le cobalt est élué avec le cuivre et le cadmium avec le zinc. Les premières mesures du chapitre 5 (plants de blé ayant poussé sur sols) ayant eu lieu avant la publication du protocole de Borrok et al.<sup>14</sup>, ces échantillons ont tous été purifiés selon le protocole de Maréchal et al.<sup>13</sup>. Les échantillons du chapitre 4 (plants de tomate et blé ayant poussés en hydroponie) ont quant à eux été purifiés selon le protocole de Borrok et al.(2008)<sup>14</sup>.

	Maréchal 1999	Borrok 2008
volume AG MP 1 (mL)	1,6	0,85
diamètre colonne (cm)	0,8	0,4
Conditionnement	6 mL HCl 6 M	4 mL HCl 10 M
Introduction	1 mL HCl 6 M	1 mL HCl 10 M
Elution matrice	10 mL HCl 6 M	4 mL HCl 10 M
Cu fraction	20 mL HCl 6 M	7 mL HCl 5 M
Fe fraction	10 mL HCl 2 M	3mL HCl 1M
Rinçage	2 mL HNO3 0.5 M	/
Zn fraction	8 mL HNO3 0.5 M	5 mL HNO3 0.5 M

**Tableau 8:** Protocole d'élution du cuivre, du fer et du zinc pour les méthodes de Maréchal et de Borrok

Les protocoles sont détaillés dans le **Tableau 8**. Pour le protocole de Maréchal et al.<sup>13</sup>, les colonnes utilisées sont les mêmes que celles décrites précédemment avec le même volume de résine. Pour le protocole de Borrok et al.(2008)<sup>14</sup>, les colonnes ont été fabriquées à l'aide de seringues en poly-propylène de 1 et 10 mL. Les colonnes de 1 mL contenaient la résine avec un fritté adapté à la taille des seringues et celles de 10 faisaient office de réservoir. Dans tous les cas, la résine utilisée est la même (AG MP 1 de Biorad) mais avec un volume de 0,85 mL pour Borrok et al.(2008)<sup>14</sup>. Le protocole de Borrok et al.(2008)<sup>14</sup> utilise des volumes d'acide beaucoup plus faibles que celui de Maréchal et al.<sup>13</sup>, ce qui est un avantage pour une moindre consommation d'acides, mais rend le protocole beaucoup plus sensible aux différents volumes utilisés (acides, résine). Dans la **Figure 15**, le protocole de Borrok et al.(2007)<sup>15</sup> a été appliqué. La seule différence entre les deux protocoles de Borrok<sup>14,15</sup> est le volume de résine, qui passe de 0,65 mL dans le protocole de 2007 à 0,85 mL dans le protocole de 2008.

Avec le protocole de Borrok et al.(2007)<sup>15</sup>, environ 25% du cuivre est élué avec la matrice, ce qui provoque des fractionnements isotopiques dans la fraction récupérée par rapport à la solution initialement introduite dans la colonne. Rajouter de la résine (ici 0,2 mL) rallonge le temps de trajet du cuivre dans la colonne et permet son élution après la matrice.



**Figure 15:** Elution du cuivre avec le premier protocole de Borrok et al. (2007)

		rendement Cu (%)	rendement Zn (%)	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)	$2\sigma$	$\delta^{66}\text{Zn}$ (‰)	$2\sigma$
Maréchal	C13_0508	98.1	99.6	-0.23	0.03	0.01	0.02
	C14_0508	99.6	98.1	-0.06	0.03	0.01	0.03
	C15_0508	98.3	98.5	0.01	0.04	-0.01	0.02
	C16_0508	97.3	98.6	0.01	0.02	0.01	0.04
	C17_0508	97.7	99.0	-0.02	0.03	0.01	0.06
	C18_0508	95.2	98.5	-0.07	0.03	0.01	0.04
Borrok	C25_1108	93.4	95.6	0.04	0.04	0.09	0.02
	C26_1108	94.2	96.8	0.01	0.04	0.05	0.02
	C28_1108	95.1	96.0	-0.04	0.02	0.03	0.01
	C29_1108	93.0	94.7	0.03	0.03	0.11	0.02

**Tableau 9:** Exemple de calibration des colonnes en cuivre et en zinc, sur des solutions standard de cuivre et zinc

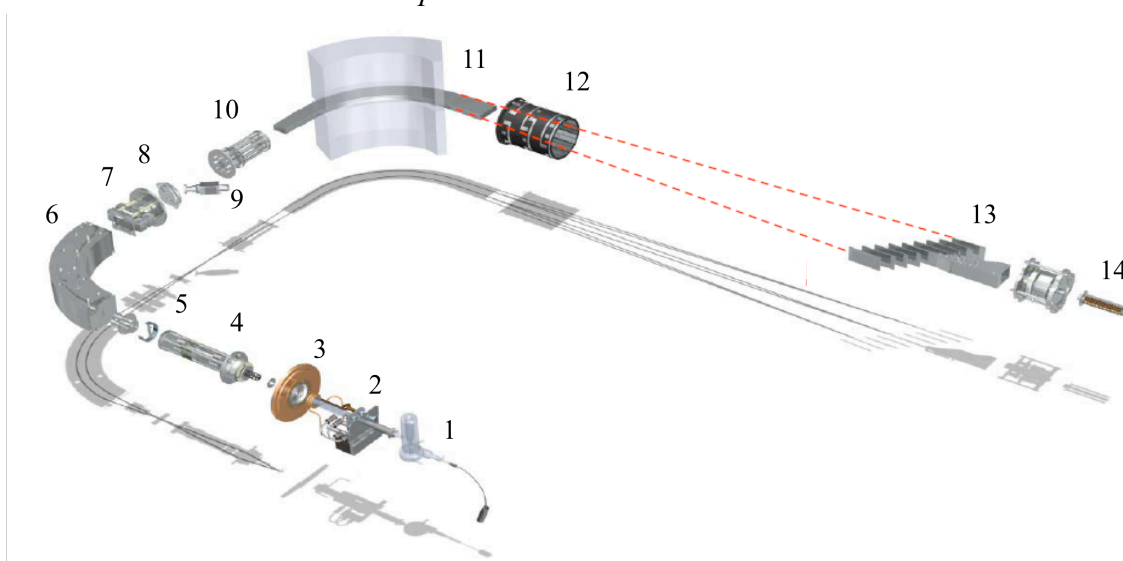
Le **Tableau 9** donne les résultats d'une calibration de colonnes (passage de standards sur les colonnes), les six premières avec le protocole de Maréchal et al.<sup>13</sup> et les quatre suivantes avec le protocole de Borrok et al.<sup>14</sup>. A l'exception de deux points, l'un en cuivre pour le protocole de Maréchal et al.<sup>13</sup> et l'autre en zinc avec le protocole de Borrok et al.<sup>14</sup>, tous les rapports



isotopiques de cuivre et de zinc des standards élués sur colonne sont indissociables des solutions standard initiales (non traitées avec les colonnes) ; en notation delta, ils sont inférieurs ou égaux à  $\pm 0,07$  ‰. Pour les deux points isotopiquement différents, cela signifie qu'il faut soit remesurer l'échantillon soit vérifier le volume de la résine pour cette colonne là.

## 4.2. Mesure des rapports isotopiques sur le MC-ICP-MS (Neptune)

### 4.2.1. Le Neptune MC-ICP-MS



**Figure 16:** Le Neptune MC-ICP-MS sans les pompes

1 : Le système d'introduction ; ici un Stable Introduction System : micronébulisateur et chambre cyclonique + chambre de Scott, 2 : la torche et le plasma, 3 : les cônes en nickel, 4 : les premières lentilles d'extraction et de focalisation, 5 : la fente source déterminant la résolution de la mesure, 6 : le secteur électrostatique, 7 : les lentilles quadropolaires de focalisation, 8 : la fente tube, 9 : la vanne tube, 10 : les lentilles quadropolaires contrôlant la forme des pics, 11 : le secteur magnétique, 12 : les lentilles quadropolaires de dispersion, 13 : les neufs cages de faraday, 14 : le multiplicateur d'électrons.

Les MC-ICP-MS (Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) sont la dernière génération des ICP-MS datant des années 90 et empruntent beaucoup aux plus récents TIMS (Thermal Ionization Mass Spectrometer). En effet, comme eux, les MC-ICP-MS comportent un secteur magnétique et plusieurs collecteurs. Le secteur magnétique permet d'améliorer la résolution et d'obtenir des pics isotopiques plats (lors des scans de masse) indispensables à une mesure précise des rapports isotopiques. Avec la multi-collection, les

différents ions sont mesurés simultanément dans les neufs cages de Faraday et de nombreux effets liés à l'instabilité du signal peuvent ainsi être évités. Le MC-ICP-MS utilisé lors de cette étude est un Neptune de Thermo Scientific (**Figure 16**). Pour notre étude, l'échantillon est introduit soit via 1) un SIS (stable introduction system) comprenant une double chambre de nébulisation (une cyclonique et une double-pass Scott) équipé d'un nébuliseur PFA micro-concentrique, soit via 2) un système d'introduction par désolvatation (sans membrane) APEX HF avec le même nébuliseur. Le système d'introduction transforme l'échantillon liquide en aérosol « sec » (avec l'APEX) ou humide (avec le SIS). L'échantillon est ensuite transféré jusqu'à la torche au bout de laquelle le plasma d'argon (à 8000°K) se forme. Le passage dans le plasma transforme l'aérosol en particules puis en gaz puis en atomes et pour finir en ions chargés positivement. Les cônes (disques en nickel percés au centre) ensuite prélèvent la partie centrale du plasma et sont la transition entre une zone à pression atmosphérique (le système d'introduction et le plasma) à une zone à pression beaucoup plus basse (autour de  $10^{-8}$  mbar dans le spectromètre de masse). Ce prélèvement d'ions est facilité par une différence de potentiel entre la partie ICP (de charge neutre) et la lentille d'extraction (à -2 kV). Les ions sont ensuite accélérés à 5 kV et focalisés avec l'aide de plusieurs lentilles (dont des quadripôles) jusqu'à une première fente source. La taille de cette fente source peut être choisie (16, 30 ou 250  $\mu\text{m}$ ) et correspond à différents modes de résolution (haute, moyenne ou basse résolution respectivement). La fente source marque aussi l'entrée dans l'analyseur électrostatique (ESA) qui réduit la dispersion en énergie de ces ions. Après le passage dans l'ESA, les ions sont accélérés jusqu'à 10 kV puis rentrent dans le secteur magnétique. Le secteur magnétique sépare les ions selon leur rapport masse/charge. Avant et après le secteur magnétique, deux quadripôles permettent l'un de refocaliser les ions et l'autre de concentrer ou de disperser le faisceau. Pour finir, les ions arrivent sur neuf collecteurs (huit mobiles et un fixe) reliés à des amplificateurs (résistances de  $10^{11} \Omega$ ), qui transforment un nombre d'ions en un signal électrique. Ces collecteurs peuvent être des cages de Faraday ou des compteurs d'ions.

#### 4.2.2. Conditions de mesure

Au cours de cette étude, le Neptune a été toujours utilisé en mode basse résolution (fente de 250 $\mu\text{m}$ ) avec des cages de Faraday pour collecteurs. Les cages de Faraday étaient positionnées de manière à pouvoir recueillir le  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ,  $^{68}\text{Zn}$ ,  $^{69}\text{Ga}$  et le

$^{70}\text{Zn}$  et les amplificateurs des cages ont été systématiquement calibrés avant chaque session de mesure. De même, à chaque début de session, les flux de gaz (argon), la position de la torche et les différents paramètres optiques ont été soigneusement optimisés afin d'obtenir une belle forme de pic et la meilleure stabilité du signal possible tout en gardant une bonne sensibilité. Chaque mesure consiste en 4 blocs de 20 cycles (un cycle durant 4,2s) et dure 5,6 minutes. Elle est précédée d'une mesure de la ligne de base et d'un centrage des pics et est suivie de 3,5 minutes de lavage à l'acide nitrique 0,5 M. Un standard composé d'un mélange de cuivre et de zinc est mesuré tous les deux échantillons. Les échantillons, de cuivre ou de zinc, sont dopés avec un standard de zinc ou de cuivre, respectivement, en respectant au maximum une concentration de 200 ppb de zinc et de 100 ppb de cuivre lors de l'utilisation de l'APEX comme système d'introduction et le double lors de l'utilisation du SIS. Dans tous les cas, un rapport Zn/Cu de 2 sera conservé. En effet, Archer et al.<sup>16</sup> et Chen et al.<sup>17</sup> ont montré que le rapport Zn/Cu influence clairement la mesure des rapports isotopiques du cuivre et du zinc dans un MC-ICP-MS. La matrice des solutions a toujours été de l'acide nitrique 0,05 M même si l'acidité de la solution ne semble pas déterminante lors de l'utilisation de l'APEX comme système d'introduction (Chen et al.<sup>17</sup>).

Pour une concentration de 200 ppb de zinc et 100 ppb de cuivre sur l'APEX, la sensibilité obtenue est habituellement de 8 à 10 V sur le  $^{64}\text{Zn}$  et le  $^{63}\text{Cu}$ . La sensibilité obtenue avec le SIS est environ deux fois moindre que celle de l'APEX. La solution de lavage, que l'on va considérer comme un « blanc machine », a un signal compris entre 0,003 V et 0,006 V pour le  $^{64}\text{Zn}$  et entre 0,001 et 0,004 V pour le  $^{63}\text{Cu}$ . Le blanc machine sera donc négligeable comparé aux solutions mesurées, typiquement entre 100 et 400 ppb. Lors de longues séances avec le passeur automatique, il arrive que le blanc en zinc monte jusqu'à 0,01 V, ce qui reste très faible. Dans nos conditions expérimentales, l'APEX aura globalement une sensibilité deux fois supérieure à celle du SIS pour le cuivre et le zinc.

### **4.3. Correction de discrimination de masse ?**

#### *4.3.1. D'où vient la discrimination de masse ?*

La discrimination de masse est définie comme la déviation du rapport isotopique mesuré par rapport à la valeur vraie de ce rapport dans l'échantillon<sup>18</sup>. Ceci incorpore deux composantes :

un biais de masse inhérent à l'instrument et des effets de matrice dûs à la nature de la solution analysée. Concernant le biais de masse inhérent à l'instrument, une grande part provient de deux phénomènes : l'expansion des atomes d'argon après le sampler cône<sup>19, 20</sup> et les effets de charge après le skimmer cône<sup>20, 21</sup>. Ces deux phénomènes favorisent la transmission des isotopes lourds. Il est probable que les autres effets qui provoquent un biais de masse instrumental aient lieu dans la zone entre le système d'introduction et le premier système de lentilles<sup>22</sup> car c'est dans cette zone qu'a lieu la plus importante déperdition d'ions dans l'appareil (Niu et al.<sup>20</sup> estiment que sur 50000 à 500000 ions injecté dans le plasma, seul un sera détecté). Albarède et al.<sup>22</sup> considèrent en effet que les ions sont transmis et détectés quantitativement une fois entrés dans le vide de l'ICP-MS. Le système d'introduction aussi joue un rôle important pour la transmission des ions et la discrimination de masse.

#### 4.3.2. Correction de la discrimination de masse

La correction de la discrimination de masse est une étape essentielle pour l'obtention de données fiables en spectrométrie de masse. Elle varie de manière significative d'une session à l'autre et même au cours de la même session. Malgré l'importance de ce phénomène, aucun consensus n'a été trouvé sur la meilleure méthode de correction des données<sup>23</sup>.

Dans la littérature de la spectrométrie de masse, trois lois sont utilisées couramment pour décrire le fractionnement de masse à l'intérieur d'un spectromètre de masse<sup>13,24</sup>. Définissons  $R$  le rapport vrai de deux isotopes de masse  $M_1$  et  $M_2$  et  $r$  le rapport mesuré de ces deux isotopes.

➔ La loi linéaire stipule que le facteur linéaire de fractionnement  $\alpha = r/R$  s'exprime comme une fonction de la différence de masse  $\Delta M = M_2 - M_1$  sous la forme

$$r \approx R \times (1 + h \times \Delta M) \quad (1)$$

où  $h$  est un coefficient de fractionnement indépendant de la masse et sera donc identique pour chaque couple d'isotopes. Ainsi si l'on ajoute un autre couple d'isotopes labélisé  $r'$  et  $R'$ , la loi linéaire correspond à la relation suivante :

$$\frac{\frac{r}{R} - 1}{\frac{r'}{R'} - 1} = \frac{\Delta M}{\Delta M'} \quad (2)$$

→ La loi puissance énonce que le facteur logarithmique de fractionnement  $\gamma = \ln(r/R)$  s'exprime en fonction de la différence de masse  $\Delta M$  ce qui donne la relation suivante :

$$r \approx R \times g^{\Delta M} \quad (3)$$

où  $g$  est un coefficient de fractionnement de masse indépendant de la masse. Avec l'ajout d'un autre couple d'isotopes, la loi puissance s'exprimera selon la formule suivante :

$$\frac{\ln\left(\frac{r}{R}\right)}{\ln\left(\frac{r'}{R'}\right)} = \frac{\Delta M}{\Delta M'} \quad (4)$$

ce qui, dans un graphique représentant  $\ln(r)$  en fonction de  $\ln(r')$ , donnera une relation linéaire.

→ La loi exponentielle suppose quant à elle que le coefficient de fractionnement logarithmique  $\xi = r/R$  peut s'exprimer comme une fonction de la différence logarithmique des masses  $\Delta(\ln M) = \ln(M_2/M_1)$ . Ceci nous amène à la relation classique :

$$r = R \left( \frac{M_1}{M_2} \right)^b \quad (5)$$

où  $b$  décrit le fractionnement de masse dans le spectromètre de masse.

Si l'on combine cette expression pour deux couples d'isotopes, on obtient la relation suivante :

$$\frac{\ln\left(\frac{r}{R}\right)}{\ln\left(\frac{r'}{R'}\right)} = \frac{\Delta \ln M}{\Delta \ln M'} \quad (6)$$

ce qui amène aussi à une relation linéaire si l'on trace  $\ln(r)$  en fonction de  $\ln(r')$ .

Sur ces trois lois, la loi linéaire peut d'ors et déjà être mise de côté pour le MC-ICP-MS. En effet, si un rapport d'isotopes suit bien la loi linéaire (Equation (1)), un rapport de rapports d'isotopes ne la vérifiera pas (Equation (2)), ce qui n'est pas cohérent. En revanche, concernant les lois puissance et exponentielle, Maréchal et al.<sup>13</sup> ont montré que ces deux lois n'étaient que des cas particuliers d'une loi de fractionnement plus générale appelée Loi

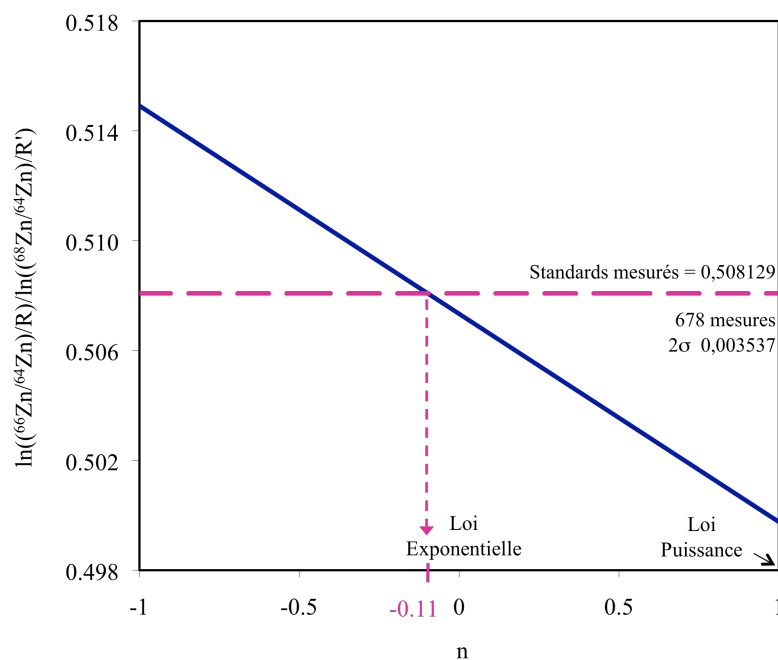
Puissance Généralisée (ou Generalized Power Law). Dans ce cadre là, le coefficient de fractionnement  $\xi = r/R$  est donc fonction de la différence  $\Delta M^n$ . La forme explicite de cette loi sera donc :

$$r = R \times g^{(M_2^n - M_1^n)} \quad (7)$$

$g$  est un coefficient de fractionnement de masse indépendant de la masse. La loi puissance simple correspond à  $n = 1$ , et la loi exponentielle à  $n = 0$ . Il est possible de déterminer expérimentalement quelle loi est la plus appropriée pour la correction de discrimination de masse à l'intérieur d'un MC-ICP-MS. En effet, la loi puissance généralisée s'écrit selon la formule suivante pour deux rapports isotopiques donnés<sup>13</sup> :

$$\frac{\ln \frac{r}{R}}{\ln \frac{r'}{R'}} = \frac{\Delta M^n}{\Delta M'^n} \quad (8)$$

Il est ainsi possible de comparer des valeurs expérimentales de rapports isotopiques mesurés (partie gauche de l'équation) aux valeurs théoriques obtenues à partir de différentes valeurs de  $n$  (partie droite de l'équation) et ainsi de déterminer la loi la plus proche de nos conditions expérimentales. En prenant les rapports  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  et  $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  pour l'ensemble des standards IPG mesurés au cours de cette thèse (678 mesures), on obtient une valeur moyenne pour la partie gauche de l'équation de 0,508129. La **Figure 17** représente la loi puissance généralisée (droite en trait plein) ainsi que la valeur moyenne 0,508129 de l'ensemble des standards de cette thèse (droite en tirets) et montre que c'est la loi exponentielle qui correspond le mieux à nos données, comme dans l'étude de Maréchal et al.<sup>13</sup>.



**Figure 17:** Détermination de la loi de discrimination de masse dans un MC-ICP-MS Neptune (loi puissance généralisée en trait plein et la valeur expérimentale en tirets).

#### 4.3.3. Formalisme pour la correction de discrimination de masse

Les méthodes les plus utilisées pour la correction de discrimination de masse pour le cuivre et le zinc sont la méthode d-SSB (direct Standard-Sample Bracketing)<sup>25, 26</sup>, l'ajout d'un autre élément comme standard interne<sup>13, 24</sup> ou la combinaison des deux<sup>27, 28</sup>. Pour certains éléments, la correction peut s'effectuer à l'aide d'un rapport invariant ( $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ,  $^{146}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ ) mais les lois de discrimination de masse sont alors encore nécessaires. De plus, il n'y a pas de rapports isotopiques invariants pour le zinc.

La méthode d-SSB consiste à mesurer alternativement standard et échantillons de manière la plus rapprochée possible et avec un instrument de mesure le plus stable possible, ceci afin d'avoir le moins de différence possible entre l'échantillon et les standards passés avant et après. La composition isotopique sera donnée uniquement en comparaison à un standard :

$$\delta^{66}\text{Zn} = \left( \frac{\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{échantillon}}}{\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (9)$$

avec  $\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{standard}}$  correspondant à la moyenne des rapports isotopiques des standards

précédant et suivant l'échantillon. Cette approche suppose donc que l'évolution temporelle entre deux standards est prédictible et peut s'approximer à une simple variation linéaire. La discrimination de masse est supposée identique pour les échantillons et pour les standards. En plus d'une grande stabilité de l'appareil, il faut aussi s'assurer qu'il n'y aura pas de variations brusques au cours de la session de mesure, comme par exemple avec la température (Chen et al.<sup>17</sup>) ou lors d'effets de matrice.

La méthode d'ajout d'un standard interne<sup>13, 24, 29</sup> a été mise en place pour contrer ces inconvénients et consiste à ajouter un élément proche chimiquement de celui que l'on étudie dans les échantillons et les standards mesurés. Cet élément aura donc un comportement similaire dans le MC-ICP-MS et permettra de corriger des variations de discrimination de masse pendant la mesure même de l'échantillon. Cependant, les coefficients de fractionnement isotopique des deux éléments ne sont pas identiques et doivent donc être « calés » par des mesures de standards. Dans le cas du zinc, l'élément ajouté sera du cuivre et inversement du zinc dans le cas du cuivre (Maréchal et al.<sup>13</sup>).

#### 4.3.4. Méthodes existantes

Dans la méthode classique de correction de la discrimination de masse de Maréchal et al.<sup>13</sup> et détaillée par Albarède et al.<sup>24</sup>, la première étape consiste à tracer  $\ln \left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{mes}}^{\text{std}}$  en fonction de

$\ln \left( \frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{mes}}^{\text{std}}$  pour tous les standards de la session de mesure. Les standards vont décrire une droite d'équation :

$$\ln \left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{mes}}^{\text{std}} = s_{\text{Cu}}^{\text{Zn}} \times \ln \left( \frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{mes}}^{\text{std}} + I \quad (10)$$



avec  $s_{Cu}^{Zn}$  la pente de la droite et  $I$  son intersection avec l'axe des ordonnées. Cette intersection  $I$  peut donc s'écrire :

$$I = \ln\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{mes} - s_{Cu}^{Zn} \times \ln\left(\frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}}\right)_{mes} \quad (11)$$

Un échantillon placé dans le même graphique sera placé, en première approximation, sur une droite parallèle à celle des standards. L'écart, pour une abscisse donnée, entre cette droite et celle des standards correspond au fractionnement isotopique du zinc de l'échantillon par rapport au standard. Mathématiquement, cela peut s'écrire :

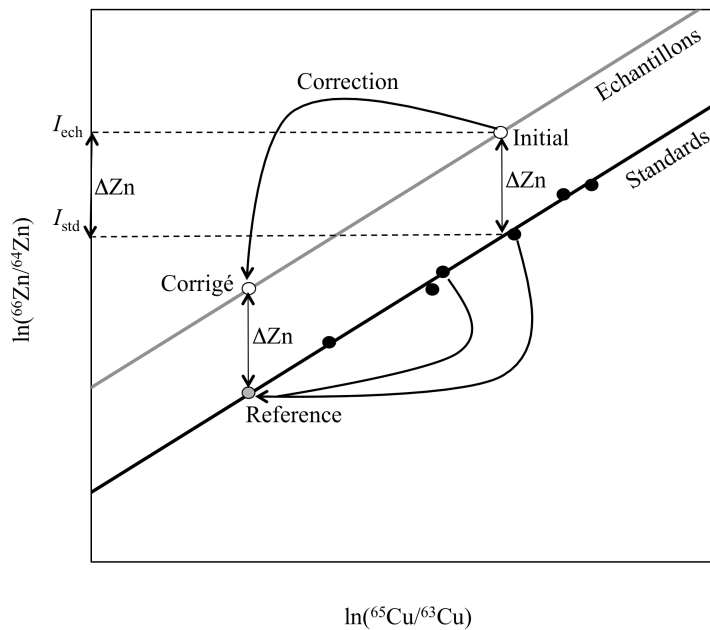
$$\ln\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{ech}^{corr} = \ln\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{std}^{vrai} + I_{ech} - I_{std} \quad (12)$$

$$\text{avec } I = \ln\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{mes}^{mes} - s_{Cu}^{Zn} \times \ln\left(\frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}}\right)_{mes}^{mes} \quad (13)$$

En traçant pour l'ensemble des standards d'une session de mesure  $\ln\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{std}^{mes}$  en fonction de

$\ln\left(\frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}}\right)_{std}^{mes}$ , la pente de la droite correspond à  $s_{Cu}^{Zn}$ . Ayant obtenu  $s_{Cu}^{Zn}$  et en supposant que les

droites des standards et des échantillons sont parallèles, il est possible de recalculer  $I_{ech}$  et  $I_{std}$  et ainsi de revenir au rapport corrigé du rapport isotopique d'intérêt.



**Figure 18:** Méthode de correction d'après Maréchal et al.<sup>13</sup>

La méthode de correction de discrimination de masse de Maréchal et al.<sup>13</sup> est résumée dans la **Figure 18**. On peut remarquer qu'il est dommage de ne pas tenir compte des valeurs mesurées pour les intersections des droites avec la droite des ordonnées.

Plus récemment, Baxter et al.<sup>23</sup> ont aussi apporté une contribution aux corrections de discrimination de masse en se basant aussi sur la loi exponentielle avec la formule suivante :

$$\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{ech}^{corr} = \frac{\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{ech}^{mes} \times \left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{std}^{vrai}}{\exp\left(\ln\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{std}^{mes}\right) \times \left(\frac{\left(\frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}}\right)_{ech}^{mes}}{\exp\left(\ln\left(\frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}}\right)_{std}^{mes}\right)}\right)^A} \quad (14)$$

avec A la pente de la droite de  $\ln\left(\frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}}\right)_{std}^{mes}$  en fonction de  $\ln\left(\frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}}\right)_{std}^{mes}$  pour tous les standards

de la session de mesure,  $\ln\left(\frac{{}^{6x}M}{{}^{6y}M}\right)_{std}^{mesuré}$  la moyenne des logarithmes des rapports non corrigés des standards sur l'ensemble de la séance.

La méthode m-SSB (modified Standard-Sample Bracketing) proposée par Mason et al.<sup>28</sup> et Peel et al.<sup>27</sup> est une combinaison de la d-SSB et de l'ajout d'un standard interne. Pour leur méthode, il convient d'écrire l'équation (9) pour le standard interne, dans notre cas  $\delta^{65}\text{Cu}$ . Ceci revient à dire que le standard ajouté dans l'échantillon peut avoir une valeur différente de celle du standard ( $\delta^{65}\text{Cu}_{d-SSB}$  non nulle). Ce  $\delta^{65}\text{Cu}_{d-SSB}$  étant utilisé comme référence, si celle-ci est fluctuante, il faut donc en tenir compte. Peel et al.<sup>27</sup> propose ensuite de soustraire ce  $\delta^{65}\text{Cu}_{d-SSB}$  au  $\delta^{66}\text{Zn}_{d-SSB}$  calculé. La composition isotopique, en notation delta, sera donc :

$$\delta^{66}\text{Zn}_{true} = \delta^{66}\text{Zn}_{d-SSB} - \delta^{65}\text{Cu}_{d-SSB} \quad (15)$$

Néanmoins, même lorsque le rapport isotopique du cuivre fluctue dans les échantillons, uniquement soustraire les  $\delta$  semble un peu simpliste.

## 4.3.5. Notre méthode de correction de discrimination de masse

Notre méthode empirique consiste à reprendre la loi exponentielle pour le rapport isotopique le plus utilisé pour le zinc :

$$\left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{ech}^{vrai} = \left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{ech}^{mes} \times \left( \frac{{}^{66}\text{M}}{{}^{64}\text{M}} \right)^{\beta_{Zn}} \quad (16)$$

$\beta$  le facteur décrivant le fractionnement isotopique. Cette expression s'écrit aussi pour le rapport isotopique du cuivre.

$$\left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{ech}^{vrai} = \left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{ech}^{mes} \times \left( \frac{{}^{65}\text{M}}{{}^{63}\text{M}} \right)^{\beta_{Cu}} \quad (17)$$

Il est prouvé depuis les travaux de Maréchal et al.<sup>13</sup> que les coefficients de fractionnement isotopique du cuivre et du zinc ( $\beta_{Cu}$  et  $\beta_{Zn}$ ) ne sont pas identiques, ce qui revient à dire que le cuivre et le zinc ne se comportent pas de la même manière vis à vis de la discrimination de masse dans le MC-ICP-MS. De nombreuses études<sup>13, 23, 24, 28</sup> considèrent implicitement que le rapport  $\beta_{Zn}/\beta_{Cu}$  reste constant au cours d'une session de mesure, i.e.  $\beta_{Zn} = a \times \beta_{Cu}$  mais que ce rapport change d'une session à l'autre. Cependant, aucune de ces études n'a été réalisée sur un MC-ICP-MS Neptune. La **Figure 19** représente  $\beta_{Zn}$  en fonction de  $\beta_{Cu}$  pour la session 04/07/08. Il est clairement visible que la relation qui relie le mieux  $\beta_{Cu}$  et  $\beta_{Zn}$  est du type  $\beta_{Zn} = a \times \beta_{Cu} + b$ .

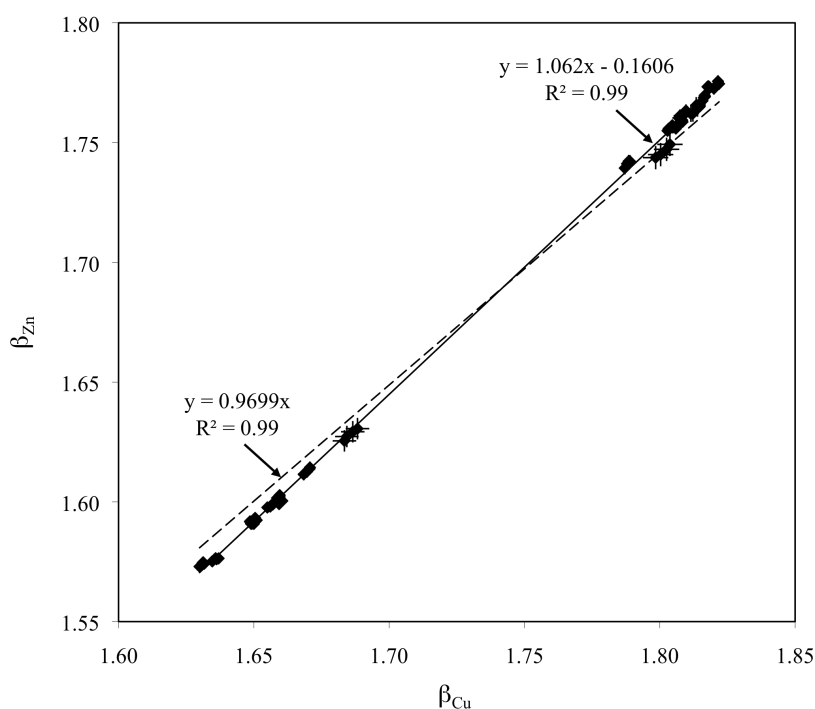
Cette droite, représentative de l'évolution de la discrimination de masse au cours de la session de mesure, va être utilisée pour corriger celle des échantillons. En effet, dans le cas des échantillons, par exemple un échantillon de zinc dopé avec un standard de cuivre, on peut déterminer un  $\beta_{Zn}$  corrigé de la forme :

$$\beta_{Zn}^{ech\ corr} = a \times \beta_{Cu}^{ech\ mes} + b \quad (18)$$

avec  $a$  et  $b$  déterminés grâce à la droite  $\beta_{Zn}$  versus  $\beta_{Cu}$  des standards. Avec ce  $\beta_{Zn}^{ech\ corr}$  et l'équation (8), on obtient un rapport  ${}^{66}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn}$  corrigé. Ceci sera aussi effectué pour les standards et aussi pour les autres rapports isotopiques du zinc ( ${}^{68}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn}$ ,  ${}^{67}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn}$  et  ${}^{68}\text{Zn}/{}^{66}\text{Zn}$ ). Le  $\delta^{66}\text{Zn}$  peut ensuite être calculé selon la formule habituelle :

$$\delta^{66}\text{Zn} = \left( \frac{\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{corr}}}{\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{std}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (19)$$

Pour chacun de ses rapports, on détermine une relation entre  $\beta_{\text{Cu}}$  et  $\beta_{\text{Zn}}$  pour chacun des isotopes du zinc à partir de la mesure des standards.



**Figure 19:**  $\beta_{\text{Zn}}$  en fonction de  $\beta_{\text{Cu}}$  le 4 juillet 2008, forçage ou non par l'origine

#### 4.4. Quel standard utiliser ?

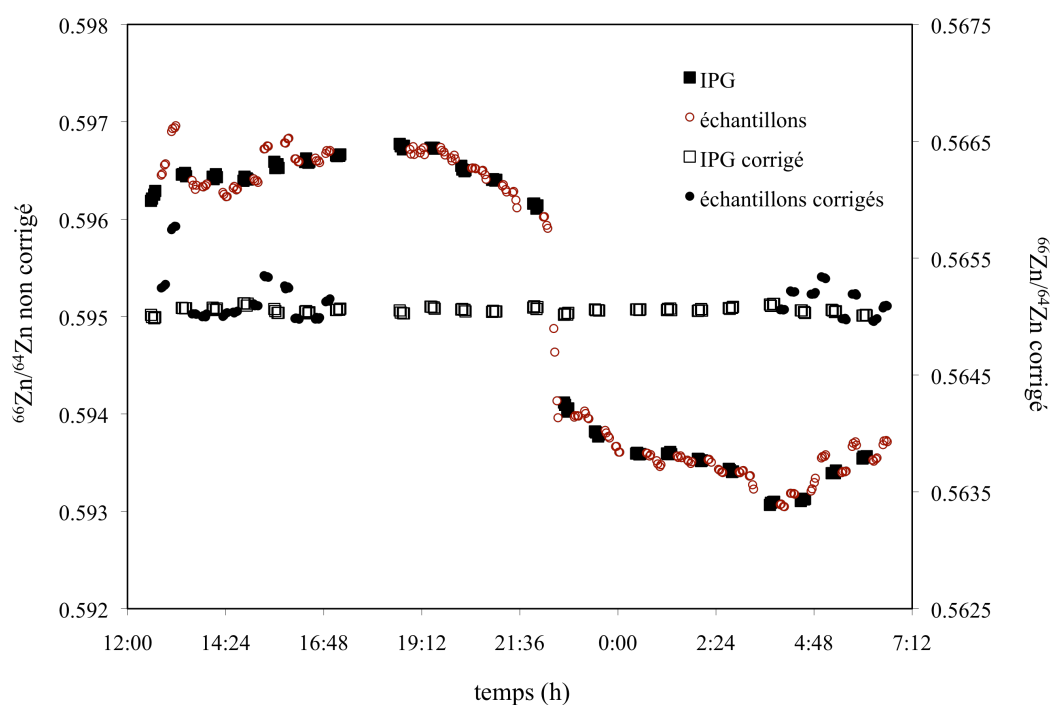
À l'heure actuelle, aucun matériel de référence n'a été déclaré standard international de référence pour le cuivre et le zinc. Pour le zinc, une solution standard Johnson Matthey (JMC) 3-0749L, utilisée initialement par le Laboratoire de l'ENS Lyon, sert de référence, mais elle n'est plus distribuée. Cloquet et al.<sup>30</sup> ont proposé qu'un standard mono-élémentaire IRMM-3702 produit par l'IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) devienne le nouveau standard international dans un futur proche. Pour le cuivre, le standard NIST Cu-SRM976, aussi épuisé, sert pour l'instant de référence. En attendant l'arrivée d'un standard

international, Chen et al.<sup>17</sup> ont calibré des solutions standard mono-élémentaires de zinc et un de cuivre par rapport aux standards JMC de Lyon et au NIST SRM et obtiennent des valeurs moyennes ( $n = 96$ ) de  $0,565055 \pm 0,000004$  ( $2\sigma$ ) et de  $0,44574 \pm 0,000004$  ( $2\sigma$ ) pour  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  et pour  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  respectivement. Ces standards seront appelés par la suite standards IPG. Pour les chapitres 3 et 4 qui ne comportent que des expériences en laboratoire, l'utilisation des standards IPG est suffisante. Par contre, pour le chapitre 5, nous avons besoin de valeurs « absolues » et les résultats de mesures isotopiques seront exprimés relativement au standard de Lyon.

#### 4.5. Comparaison des différentes méthodes de correction de la discrimination de masse

Dans ce paragraphe, nous détaillerons le traitement des mesures de standards et d'échantillons, acquis lors d'une session (4 juillet 2008) par différentes méthodes.

La **Figure 20** montre tout d'abord l'importance de la correction de discrimination de masse. Elle représente les rapports bruts  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  des standards et échantillons de la session du 04/07/08 (sur l'échelle de gauche) ainsi que les rapports corrigés des standards et échantillons avec notre méthode empirique, appelée par la suite méthode Louvat (sur l'échelle de droite). Bien que les valeurs avant et après corrections soient tellement différentes qu'elles nécessitent deux échelles, le même intervalle est conservé pour les échelles de gauche et de droite afin de permettre une meilleure comparaison. Ainsi les rapports bruts de  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  des standards ont une valeur moyenne de 0,595139 avec un  $2\sigma$  de 0,001507 alors que les rapports corrigés ont une valeur moyenne de 0,565055 et un  $2\sigma$  de 0,000052 (**Tableau 10**). Il est donc clair que la correction de discrimination de masse apporte une amélioration indispensable de précision en plus de la justesse.

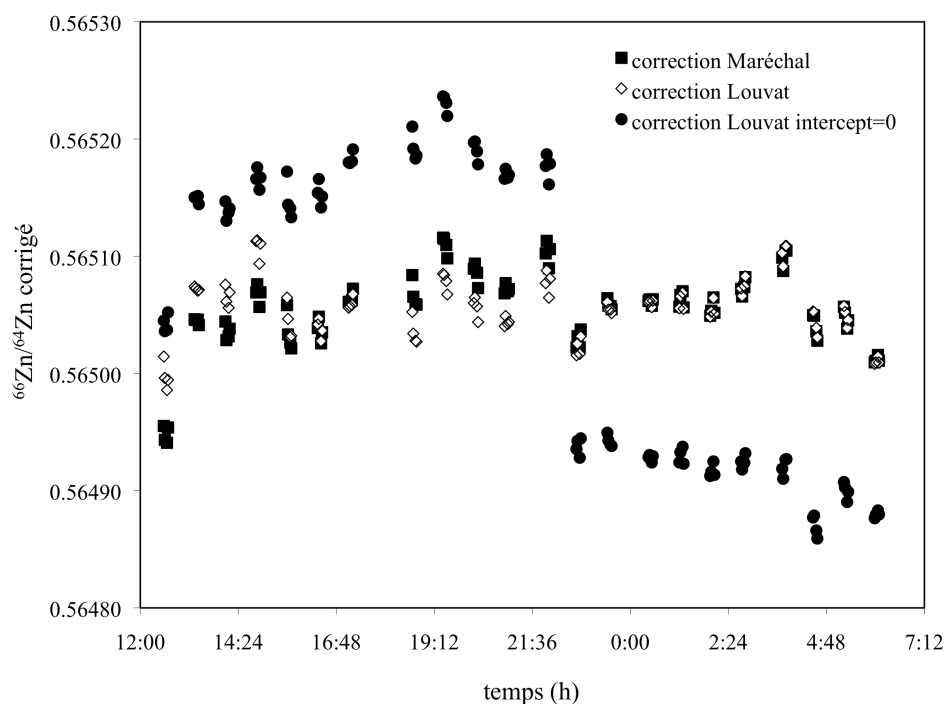


**Figure 20:** Rapports bruts et corrigés du  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  du 4 juillet 2008 (Les échantillons non représentés comme corrigés sont des échantillons de cuivre)

Il est aussi intéressant de comparer la méthode Louvat à celles précédemment étudiées. Les résultats pour les 22 standards de la session du 04 juillet 08 se trouvent dans le Tableau 10. Contrairement aux précédentes études<sup>13, 27</sup>,  $\beta_{\text{Cu}}$  est systématiquement supérieur à  $\beta_{\text{Zn}}$  pour une mesure. Comme aucune mesure de  $\beta$  n'a été publiée pour le cuivre et le zinc sur le Neptune, il semble probable que celui-ci dépende du type de MC-ICP-MS utilisé et de son optimisation. En particulier, les potentiels appliqués à la source des ions sont très différents entre le MC-ICP-MS Neptune et le MC-ICP-MS Nu plasma par exemple. Dans le cas du Neptune, le système d'introduction et le plasma sont au potentiel nul et un premier potentiel n'est appliqué qu'après les cônes alors que pour le Nu, la source est déjà placée à un potentiel élevé.

Tout d'abord, comparons l'effet du forçage ou non par l'origine sur la correction empirique présentée dans cette étude. Dans le Tableau 10, on voit clairement que, individuellement, chaque standard a un  $2\sigma$  assez comparable pour chaque correction. Cependant, pour la correction forcée par l'origine, la valeur moyenne en  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  de tous les standards

(0,565050) est légèrement différente de la valeur attendue (la valeur vraie du standard 0,565055) et le  $2\sigma$  est beaucoup plus élevé (0,000262) que celui de la correction non forcée par l'origine (0,000052). Ceci se retrouve dans la **Figure 21** où la correction forcée par l'origine est représentée en noir et la correction non forcée par l'origine est représentée en orange.



**Figure 21:** Comparaison de différents formalismes de correction de la discrimination de masse sur des solutions standard lors de la session du 04 juillet 08 (Maréchal<sup>13</sup>, Louvat et Louvat avec forçage par l'origine)

Les deux dernières colonnes du **Tableau 10** donnent les rapports corrigés selon les méthodes de Maréchal et al.<sup>13</sup> et de Baxter et al.<sup>23</sup>. Les résultats pour ces deux méthodes sont similaires à cette précision. De plus, les moyennes et  $2\sigma$  de l'ensemble des standards pour les deux méthodes sont égaux. Dans la suite de ce chapitre, nous considérerons donc que ces deux méthodes sont équivalentes et garderons la méthode de Maréchal et al.<sup>13</sup> comme référence pour plus de commodité.

La méthode Louvat et celle de Maréchal et al.<sup>13</sup> donnent des valeurs sensiblement différentes jusqu'au standard 12 pour s'estomper par la suite. De plus, les  $2\sigma$  obtenus pour chaque standard avec la correction de Maréchal sont meilleurs que pour la correction empirique de Louvat. Toutefois, le  $2\sigma$  obtenu sur la moyenne des standards est meilleur pour notre

correction empirique que pour celle de Maréchal et al.<sup>13</sup>. Ainsi, notre méthode semble mieux tenir compte de l'évolution de la discrimination de masse sur l'ensemble de la session alors que la méthode de Maréchal et al.<sup>13</sup> sera meilleure à l'échelle de chaque standard ou échantillon.

Le **Tableau 11** présente les résultats des différentes corrections en notation  $\delta$  obtenues sur les échantillons de zinc passés le 04/07/08 ainsi que les  $\beta_{\text{Cu}}$  et  $\beta_{\text{Zn}}$  associés. La méthode d-SSB donne des résultats significativement différents de toutes les autres méthodes avec des valeurs en moyenne plus faibles et des écart-types plus importants. Cette méthode ne semble donc pas adaptée pour la mesure isotopique du cuivre et du zinc en MC-ICP-MS surtout lorsque la discrimination de masse varie beaucoup, par exemple à cause d'effets de matrice. Les autres méthodes permettent l'obtention de résultats très comparables avec des écarts en  $\delta^{66}\text{Zn}$  compris entre 0.00 ‰ et 0.08 ‰, la moyenne de ces écarts étant de 0.01 ‰. Étonnamment, alors que l'influence de la droite des  $\beta$  était clairement visible sur les rapports isotopiques corrigés des standards, rien n'est visible ici pour les échantillons. Ceci est probablement dû à l'importante variation de la discrimination de masse au cours de cette session. L'absence de différence entre les diverses méthodes indique sûrement que les fractionnements sont trop faibles et les incertitudes encore trop fortes pour que l'on puisse les voir.



	$\beta_{\text{Zn}}$	$\beta_{\text{Cu}}$	Sans Correction		Louvât		intersection = 0		Maréchal 1999		Baxter 2006	
			$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$2\sigma$	$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$2\sigma$	$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$2\sigma$	$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$2\sigma$	$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$2\sigma$
IPG 1	1.75	1.80	0.596236	0.000090	0.564998	0.000024	0.565043	0.000015	0.564948	0.000007	0.564948	0.000007
IPG 2	1.76	1.81	0.596459	0.000028	0.565072	0.000003	0.565149	0.000006	0.565045	0.000002	0.565045	0.000002
IPG 3	1.76	1.81	0.596435	0.000042	0.565066	0.000017	0.565139	0.000014	0.565036	0.000007	0.565036	0.000007
IPG 4	1.76	1.80	0.596414	0.000036	0.565108	0.000019	0.565166	0.000016	0.565068	0.000008	0.565068	0.000008
IPG 5	1.76	1.81	0.596551	0.000063	0.565044	0.000032	0.565148	0.000034	0.565035	0.000016	0.565035	0.000016
IPG 6	1.77	1.81	0.596595	0.000039	0.565038	0.000016	0.565153	0.000020	0.565037	0.000009	0.565037	0.000009
IPG 7	1.77	1.82	0.596655	0.000015	0.565060	0.000011	0.565183	0.000011	0.565064	0.000005	0.565064	0.000005
IPG 8	1.77	1.82	0.596748	0.000046	0.565035	0.000024	0.565193	0.000025	0.565067	0.000012	0.565067	0.000012
IPG 9	1.77	1.82	0.596731	0.000009	0.565079	0.000016	0.565231	0.000015	0.565110	0.000008	0.565110	0.000008
IPG 10	1.76	1.81	0.596514	0.000048	0.565056	0.000018	0.565191	0.000018	0.565085	0.000009	0.565086	0.000009
IPG 11	1.76	1.80	0.596404	0.000012	0.565044	0.000007	0.565169	0.000008	0.565072	0.000004	0.565072	0.000004
IPG 12	1.74	1.79	0.596143	0.000049	0.565078	0.000019	0.565176	0.000022	0.565103	0.000010	0.565103	0.000010
IPG 13	1.63	1.69	0.594073	0.000082	0.565022	0.000015	0.564938	0.000015	0.565028	0.000008	0.565029	0.000008
IPG 14	1.61	1.67	0.593797	0.000046	0.565055	0.000008	0.564942	0.000010	0.565059	0.000004	0.565059	0.000004
IPG 15	1.60	1.66	0.593592	0.000014	0.565060	0.000005	0.564928	0.000006	0.565062	0.000003	0.565062	0.000003
IPG 16	1.60	1.66	0.593595	0.000021	0.565061	0.000014	0.564929	0.000014	0.565063	0.000007	0.565063	0.000007
IPG 17	1.60	1.66	0.593528	0.000021	0.565054	0.000014	0.564917	0.000011	0.565055	0.000007	0.565055	0.000007
IPG 18	1.59	1.65	0.593418	0.000029	0.565074	0.000014	0.564925	0.000011	0.565073	0.000007	0.565074	0.000007
IPG 19	1.57	1.63	0.593087	0.000029	0.565103	0.000016	0.564921	0.000016	0.565099	0.000008	0.565099	0.000008
IPG 20	1.58	1.64	0.593121	0.000022	0.565044	0.000022	0.564870	0.000019	0.565041	0.000011	0.565041	0.000011
IPG 21	1.59	1.65	0.593398	0.000027	0.565049	0.000016	0.564900	0.000014	0.565048	0.000008	0.565048	0.000008
IPG 22	1.60	1.66	0.593556	0.000021	0.565010	0.000006	0.564880	0.000005	0.565012	0.000003	0.565012	0.000003
moy	1.69	1.74	0.595139	0.003067	0.565055	0.000052	0.565050	0.000262	0.565055	0.000069	0.565055	0.000069
$2\sigma$	0.17	0.16										

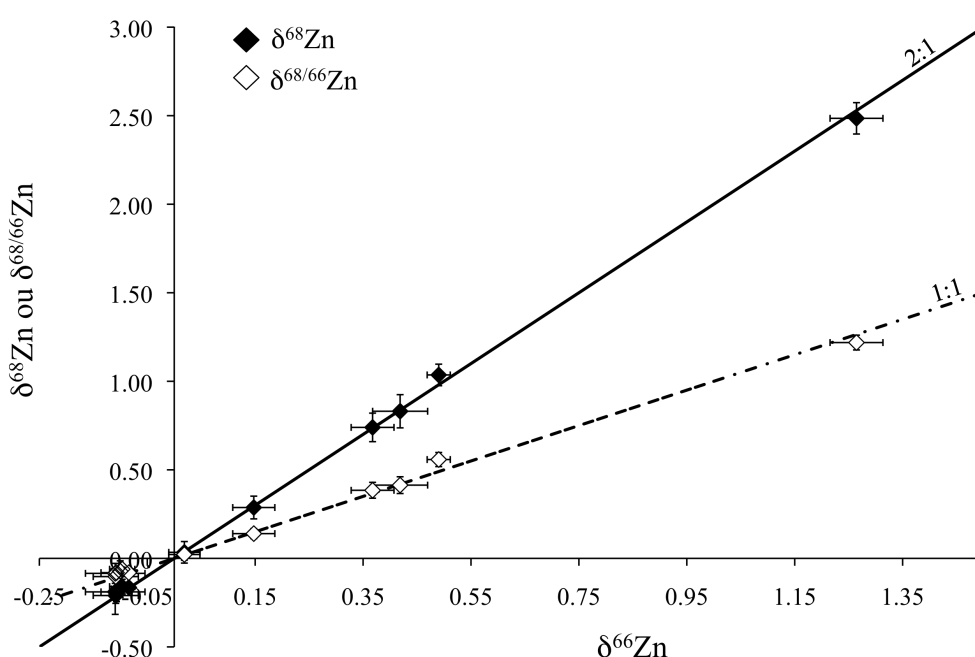
**Tableau 10:** Comparaison des différentes méthodes de correction de discrimination de masse ( $2\sigma$  : écart-type sur la mesure de quatre blocs) sur des standards isotopiques IPGP.

Echantillon	$\beta_{Zn}$	$\beta_{Cu}$	SSB		Louvât y=ax+b		Louvât y=ax		Maréchal		Baxter		Peel	
			$\delta^{66}Zn$	$2\sigma$	$\delta^{66}Zn$	$2\sigma$	$\delta^{66}Zn$	$2\sigma$	$\delta^{66}Zn$	$2\sigma$	$\delta^{66}Zn$	$2\sigma$	$\delta^{66}Zn$	$2\sigma$
RTT 212	1.76	1.80	<b>0.34</b>	0.40	<b>0.42</b>	0.05	<b>0.40</b>	0.09	<b>0.41</b>	0.07	<b>0.41</b>	0.07	<b>0.40</b>	0.10
RTT 211	1.78	1.80	<b>0.92</b>	0.17	<b>1.26</b>	0.05	<b>1.18</b>	0.06	<b>1.21</b>	0.05	<b>1.21</b>	0.05	<b>1.20</b>	0.01
PAB 212	1.75	1.81	<b>-0.17</b>	0.25	<b>-0.08</b>	0.01	<b>-0.10</b>	0.03	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.10</b>	0.05
PAB 211	1.75	1.81	<b>-0.17</b>	0.09	<b>-0.11</b>	0.04	<b>-0.12</b>	0.04	<b>-0.12</b>	0.04	<b>-0.12</b>	0.04	<b>-0.12</b>	0.00
PAT 212	1.75	1.80	<b>-0.30</b>	0.14	<b>-0.11</b>	0.06	<b>-0.15</b>	0.03	<b>-0.14</b>	0.04	<b>-0.14</b>	0.04	<b>-0.15</b>	0.03
PAT 211	1.75	1.80	<b>-0.17</b>	0.10	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.11</b>	0.01	<b>-0.11</b>	0.01	<b>-0.11</b>	0.01	<b>-0.11</b>	0.01
PAB 221	1.76	1.80	<b>-0.11</b>	0.10	<b>0.02</b>	0.03	<b>-0.01</b>	0.03	<b>0.00</b>	0.03	<b>0.00</b>	0.03	<b>-0.01</b>	0.00
RTB 212	1.77	1.81	<b>0.39</b>	0.11	<b>0.49</b>	0.02	<b>0.47</b>	0.01	<b>0.47</b>	0.01	<b>0.47</b>	0.01	<b>0.47</b>	0.01
RTB 211	1.78	1.81	<b>0.40</b>	0.18	<b>0.37</b>	0.04	<b>0.38</b>	0.04	<b>0.37</b>	0.04	<b>0.37</b>	0.04	<b>0.37</b>	0.03
PAT 221	1.77	1.82	<b>0.04</b>	0.12	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.07</b>	0.02	<b>-0.08</b>	0.02	<b>-0.08</b>	0.02	<b>-0.07</b>	0.01
PAB 215	1.77	1.82	<b>-0.02</b>	0.13	<b>-0.11</b>	0.03	<b>-0.09</b>	0.02	<b>-0.09</b>	0.02	<b>-0.09</b>	0.02	<b>-0.09</b>	0.02
RTT 214	1.77	1.81	<b>0.10</b>	0.09	<b>0.15</b>	0.04	<b>0.13</b>	0.02	<b>0.14</b>	0.04	<b>0.14</b>	0.04	<b>0.14</b>	0.00
PAB 224	1.57	1.63	<b>-0.06</b>	0.09	<b>-0.04</b>	0.01	<b>-0.04</b>	0.02	<b>-0.04</b>	0.01	<b>-0.04</b>	0.01	<b>-0.04</b>	0.01
RTB 224	1.58	1.63	<b>0.12</b>	0.03	<b>0.26</b>	0.02	<b>0.25</b>	0.02	<b>0.26</b>	0.02	<b>0.26</b>	0.02	<b>0.26</b>	0.00
RTB 221	1.58	1.64	<b>0.09</b>	0.40	<b>0.27</b>	0.02	<b>0.25</b>	0.04	<b>0.26</b>	0.03	<b>0.26</b>	0.03	<b>0.26</b>	0.14
RTB 214	1.60	1.64	<b>0.43</b>	0.09	<b>0.51</b>	0.02	<b>0.50</b>	0.02	<b>0.51</b>	0.02	<b>0.51</b>	0.02	<b>0.50</b>	0.01
PAB 214	1.59	1.65	<b>-0.07</b>	0.05	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.10</b>	0.02	<b>-0.10</b>	0.00
RTT 222	1.61	1.66	<b>0.31</b>	0.14	<b>0.30</b>	0.02	<b>0.30</b>	0.02	<b>0.30</b>	0.02	<b>0.30</b>	0.02	<b>0.30</b>	0.02
PAT 223	1.60	1.66	<b>-0.04</b>	0.10	<b>-0.07</b>	0.04	<b>-0.07</b>	0.04	<b>-0.07</b>	0.04	<b>-0.07</b>	0.04	<b>-0.07</b>	0.00
RTB 225	1.61	1.66	<b>0.26</b>	0.13	<b>0.14</b>	0.03	<b>0.15</b>	0.04	<b>0.14</b>	0.04	<b>0.14</b>	0.04	<b>0.14</b>	0.01

**Tableau 11:** Comparaison des différentes corrections de discrimination de masse sur les  $\delta^{66}Zn$  des échantillons de plantes,

avec  $2\sigma$  : écart-type sur la mesure de quatre blocs calculé selon la formule suivante :  $2\sigma = 2 \times \left[ \left( \frac{\left( \frac{{}^{66}Zn}{{}^{64}Zn} \right)_{ech} + 2\sigma_{ech}}{\left( \frac{{}^{66}Zn}{{}^{64}Zn} \right)_{std}} - 1 \right) \times 1000 \right] - \delta^{66}Zn_{ech}$

Dans le cas du zinc, la fiabilité des mesures (absence d'interférences,...) peut se vérifier dans un diagramme tri-isotopique comprenant les  $\delta^{66/64}\text{Zn}$ ,  $\delta^{68/64}\text{Zn}$  et  $\delta^{68/66}\text{Zn}$ . En effet, si le fractionnement mesuré dépend de la masse, le fractionnement mesuré en  $\delta^{68/64}\text{Zn}$  sera le double de ceux mesurés en  $\delta^{66/64}\text{Zn}$  et en  $\delta^{68/66}\text{Zn}$ , qui seront égaux. Les analyses ne vérifiant pas cette relation sont écartées. Sur la **Figure 22**, sont représentés  $\delta^{68/64}\text{Zn}$  (triangles noirs pleins) et  $\delta^{68/66}\text{Zn}$  (triangles noirs vides) en fonction de  $\delta^{66/64}\text{Zn}$  ainsi que la droite de pente 2 (trait noir) et la droite de pente 1 (trait pointillé) pour la séance du 04/07/08. Ici les échantillons mesurés suivent bien un fractionnement dépendant de la masse.



**Figure 22:** Fractionnement isotopique dépendant de la masse pour les isotopes du zinc dans les échantillons du 4 juillet 2008, les barres d'erreur correspondent à l'erreur interne lors de la mesure.

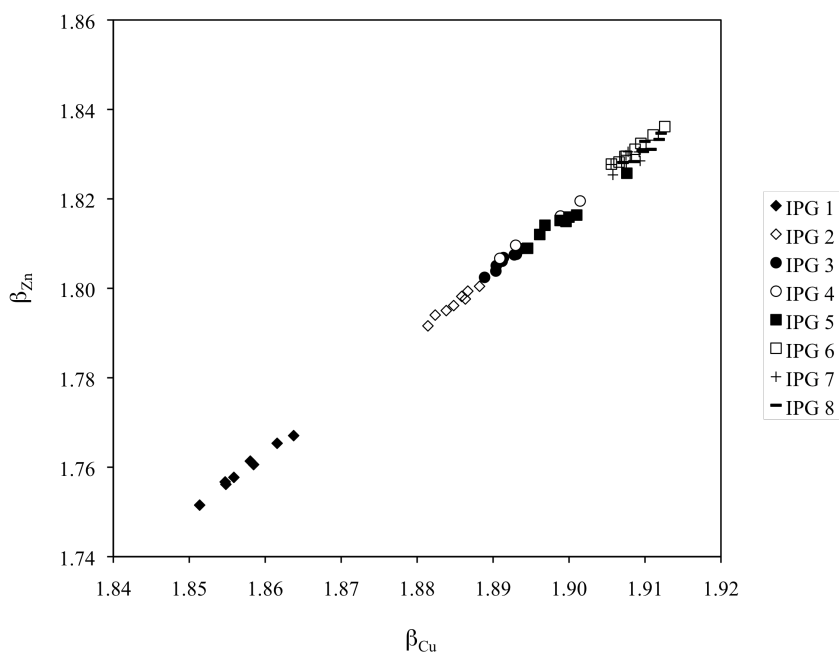
#### 4.6. Influence du système d'introduction

Au fil des sessions de mesure et notamment pour les mesures d'échantillons naturels ou « complexes », il est apparu que  $\beta_{\text{Cu}}$  et  $\beta_{\text{Zn}}$  ne décrivaient pas une mais plusieurs droites au cours d'une même session. Chen et al.<sup>17</sup> ont aussi remarqué que plusieurs régressions linéaires étaient nécessaires pour appliquer la correction de discrimination de masse. Or le choix de la droite de régression est crucial pour la correction des données. Cette variation des droites va

dépendre du système d'introduction (APEX ou SIS), de la pureté des échantillons et de leur nature, etc... Pour commencer, étudions l'influence du système d'introduction.

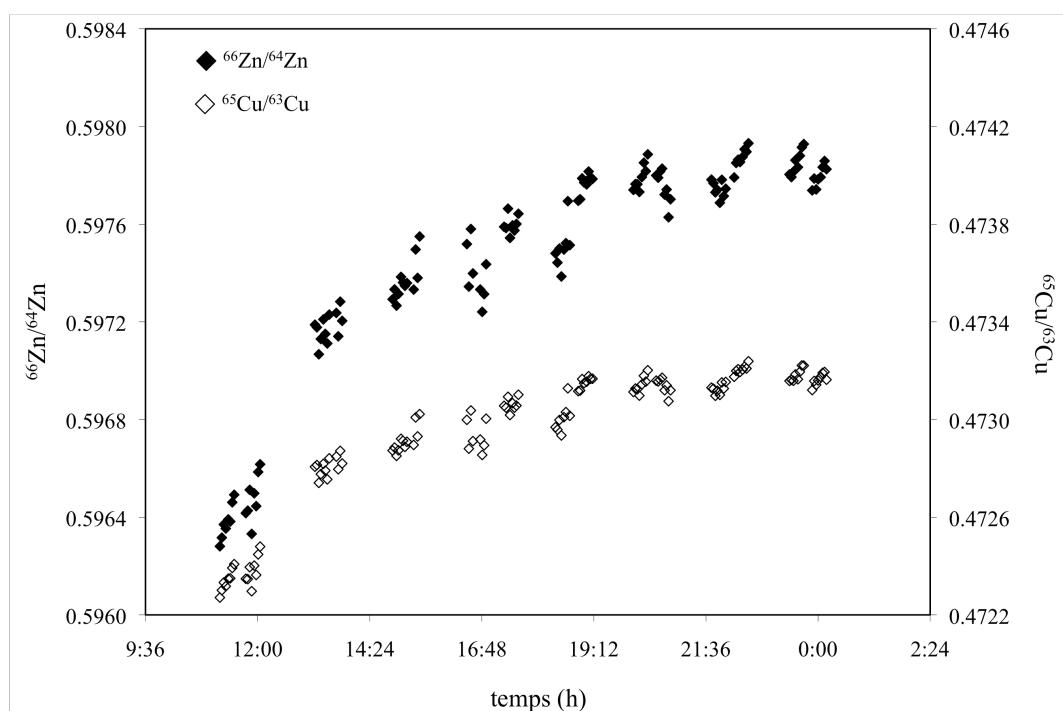
#### 4.6.1. Système d'introduction SIS

Le SIS (Stable Introduction System) ou Double scott cyclonic spray chamber a été utilisé pour les six premières séances. Sur l'ensemble de ces séances, deux comportements principaux se dégagent. Tout d'abord les séances « réussies » où une seule régression linéaire suffit à décrire les  $\beta$  pour l'ensemble de la séance. La séance du 07/06/06 (**Figure 23**) est représentative de ces séances réussies. L'évolution en détail pour les standards de la session du 07/06/06 (**Figure 23**) montre que les premiers standards ont des valeurs de  $\beta$  plus faibles que les standards suivants.



**Figure 23:** Droite des  $\beta$  détaillée pour les standards IPG de la séance du 7 juin 2006

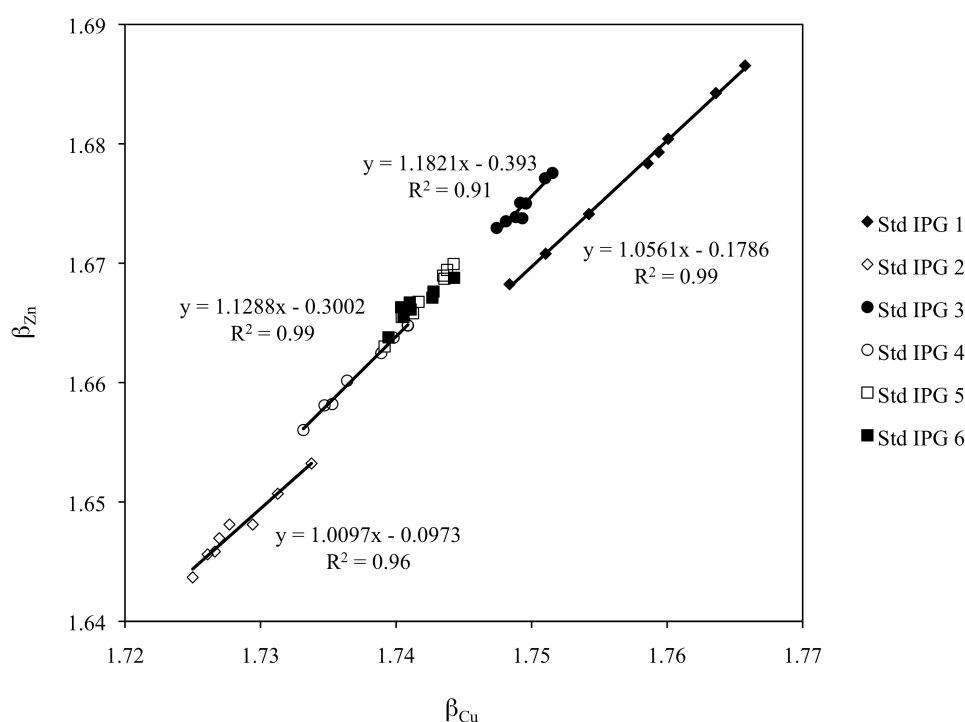
De plus, les valeurs de  $\beta$  étant liées aux rapports bruts, l'évolution des rapports bruts au cours du temps est aussi caractéristique, avec une augmentation importante en début de session puis une stabilisation (**Figure 24**). Au cours de cette séance, uniquement des tests d'élution de colonnes (passage d'un standard IPG sur colonnes) ont été passés. Ces observations ont pu être faites sur plusieurs journées de mesure (18/05/06, 07/06/06, 26/10/06 et 22/11/06).



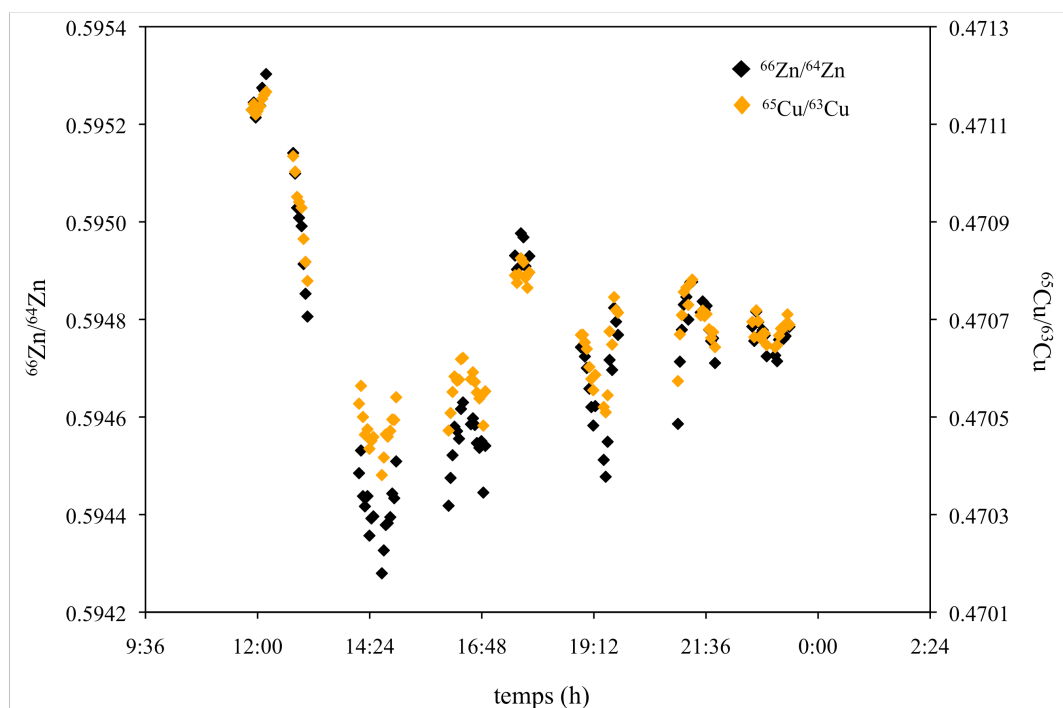
**Figure 24:** rapports bruts du cuivre et du zinc pour les standards IPG de la séance du 7 juin 2006

Pour les sessions « non réussies », comme celle du 05/07/06 (voir **Figure 25**), la droite se démultiplie et il n'est pas judicieux de chercher à faire passer une seule droite de régression pour les standards. De plus, l'évolution temporelle des  $\beta$  des standards est aussi différente de celle des sessions réussies, avec cette fois des valeurs plus élevées en début de séance et des oscillations par la suite (**Figure 25**). La même tendance s'observe pour les rapports bruts des isotopes du cuivre et du zinc (**Figure 26**), avec une baisse importante des valeurs des rapports isotopiques en début de session puis des oscillations. Il est intéressant de noter que les échantillons passés lors de cette séance sont des tests d'élution sur colonnes, c'est-à-dire similaires à ceux passés le 07/06/06.

Ceci a aussi pu être observé le 09/10/06 et malheureusement, aucune explication n'a pu être avancé pour le moment pour ces deux types de comportement. Ceci peut être dû à des variations de l'instrument, principalement au niveau du système d'introduction.



**Figure 25:** Droite des  $\beta$  détaillée du 5 juillet 2006 (avec le SIS), les échantillons entre les standards 1 et 2 sont à traiter séparément des échantillons mesurés entre les standards 3 et 6



**Figure 26:** Rapports bruts du cuivre et du zinc le 5 juillet 2006 (avec le SIS)

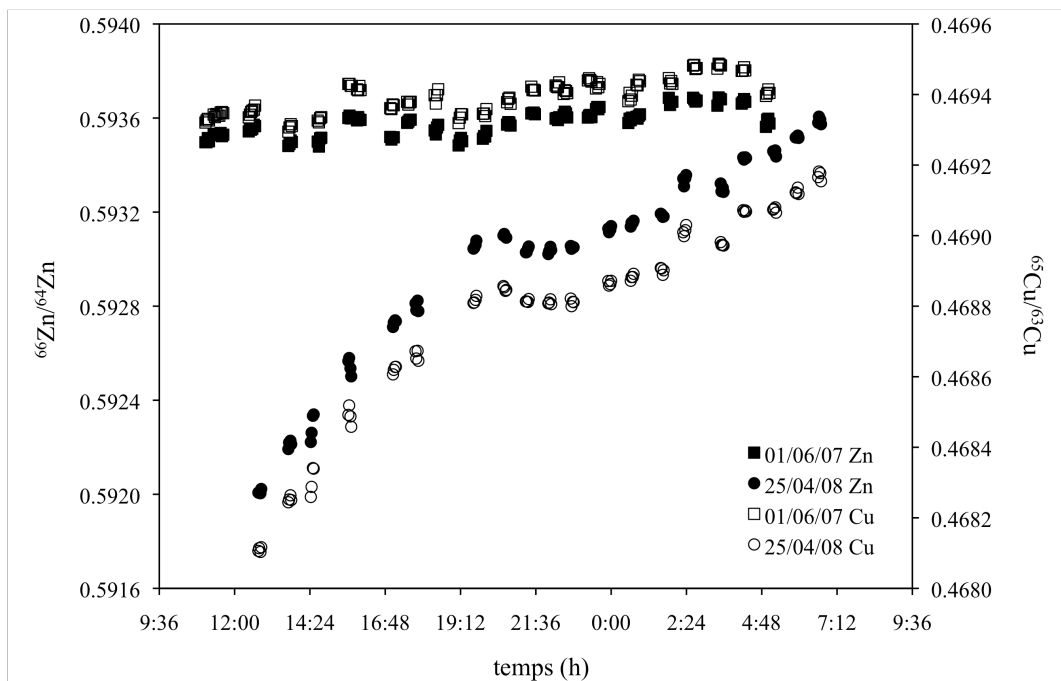
#### 4.6.2. Système d'introduction APEX

Comparé au SIS, l'APEX a une meilleure sensibilité et une plus grande stabilité et permet ainsi un écart-type plus faible pour chaque mesure. Contrairement au SIS, aucun comportement particulier (augmentation ou diminution de la valeur des  $\beta$ ) n'a pu être retrouvé d'une session à l'autre. La stabilité obtenue grâce à l'APEX a sûrement influencé cet état de fait et cela a des implications pour la correction de la discrimination de masse car avec l'APEX, l'évolution de celle-ci au cours de la session de mesure sera moins importante qu'avec le SIS.

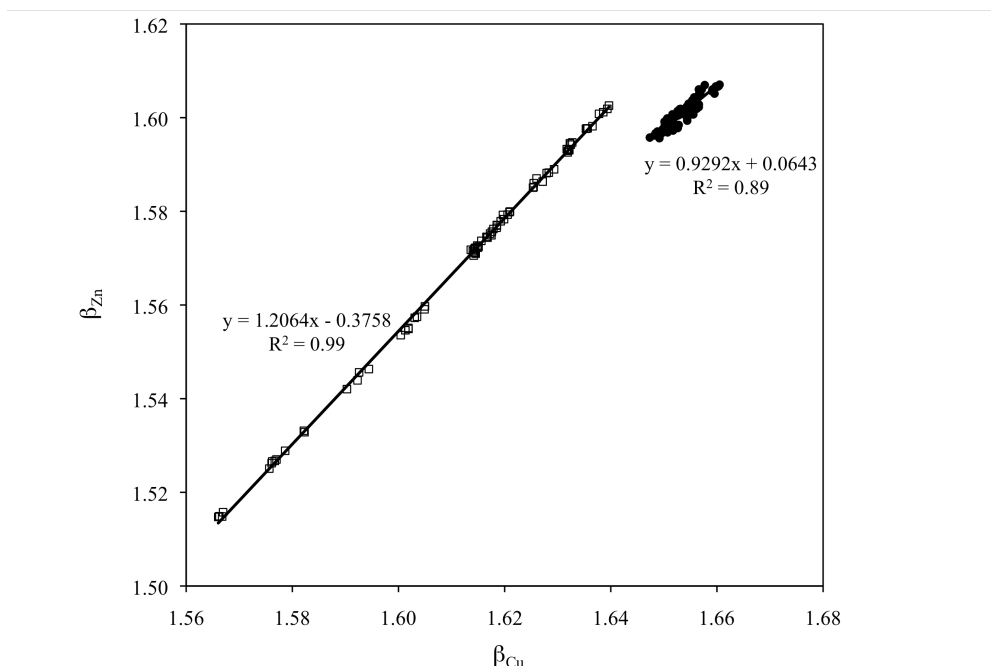
En effet, alors que pour le SIS, les  $\beta$  varient de 0,05 à 0,1 au cours d'une session de mesure, pour l'APEX, la variation sur les  $\beta$  ( $\Delta\beta$ ) au cours d'une session de mesure peut n'être que de 0,01. Lors d'une séance avec un très petit  $\Delta\beta$ , la régression linéaire pour les corrections de discrimination de masse sera plus difficile à déterminer. Les **Figure 27** et **Figure 28** représentent la variation des rapports bruts en cuivre et en zinc pour deux séances réalisées avec l'APEX (01/06/07 et 25/04/08) ainsi que les droites de  $\beta$  associées. La journée du 25/04/08 est caractérisée par une grande variation en rapports bruts et donc en  $\beta$ , alors que la journée du 01/06/07 ne présente que peu de variations. Aucun effet de matrice visible pour le 25/04/08 ne permet d'expliquer ces différences. En conséquence, le coefficient de corrélation pour la droite du 25/04/08 est visiblement bien meilleur que celui du 01/06/07.

Une explication possible peut venir des échantillons mesurés lors de ces séances. En effet, la présence d'autres éléments ou de matière organique dans les solutions mesurées entraîne des variations importantes dans les rapports bruts mesurés<sup>16, 31-33</sup>. Cependant, cela ne semble pas être le cas ici car les échantillons mesurés lors du 25/04/08 sont à priori plus simples que ceux du 01/06/07 (tous ont bien entendu subi une étape de purification chimique). Au cours de la journée du 01/06/07, des échantillons purifiés de plantes ont été passés. Le 25/04/08, ce sont en revanche des échantillons provenant d'expériences chimiques (chapitre 3), c'est-à-dire qui, avant purification, contenaient du zinc, un électrolyte ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$   $2.10^{-3}$  M) et  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  d'acide humique, donc une matrice très bien contrainte et relativement « limitée ». On s'attendrait donc, à priori, à ce que les échantillons de plantes provoquent plus de variations de la discrimination de masse, liés à des effets de matrice. Il est donc difficile dans ce cas d'associer ces différences à des changements en composition chimique. Des modifications

dans les conditions de mesures (réglages, changement de cônes, de nébuliseur...) seraient peut-être responsables de ces changements.



**Figure 27:** Comparaison des rapports bruts du cuivre et du zinc pour les séances du 01 juin 2007 et du 25 avril 2008 (avec APEX)



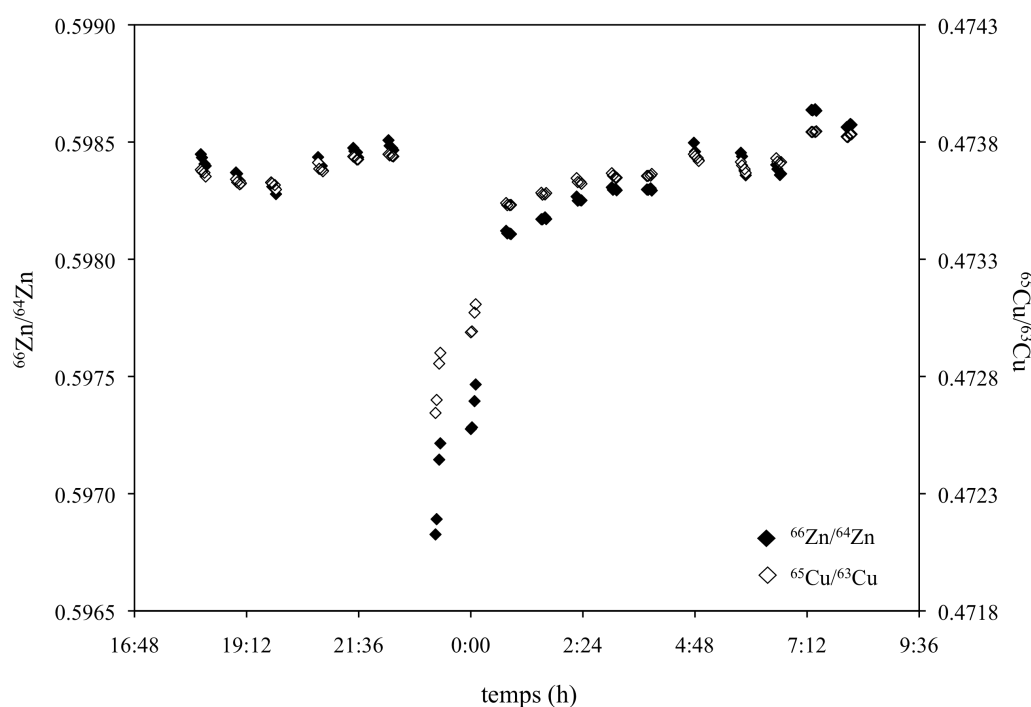
**Figure 28:** Comparaison des droites de  $\beta$  des séances du 1 juin 2007 et du 25 avril 2008



#### 4.7. Effets de matrice

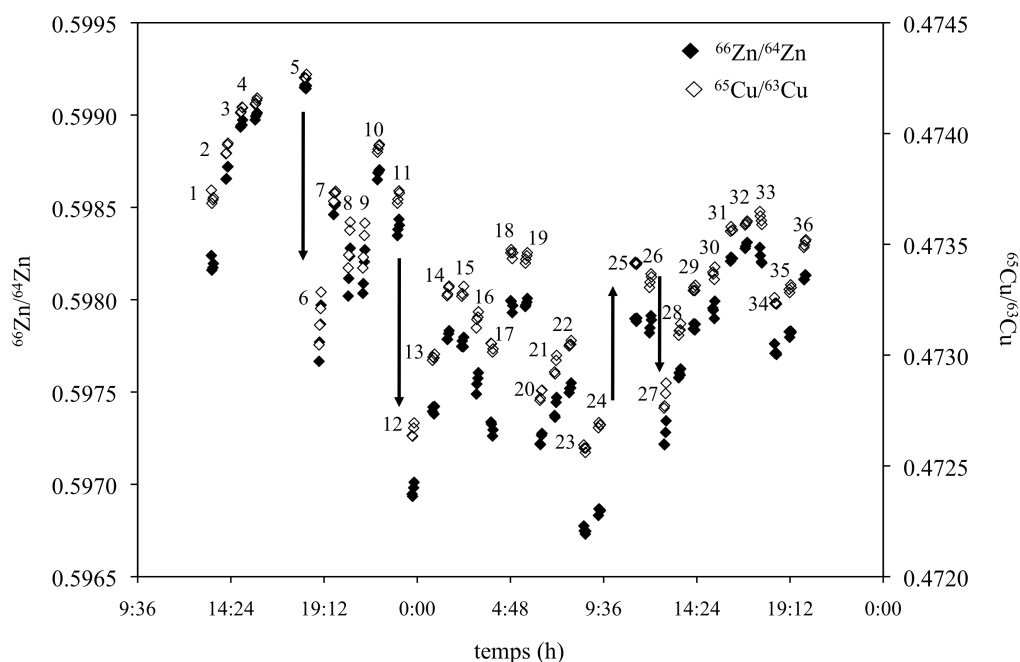
Les effets de matrice peuvent être de deux types<sup>21, 22</sup>, spectraux ou non-spectraux. Les effets de matrice de type spectraux incluent les interférences isobariques élémentaires (comme le  $^{64}\text{Ni}$  sur le  $^{64}\text{Zn}$ ), les interférences moléculaires (comme le  $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ar}$  sur le  $^{63}\text{Cu}$ ) et les interférences des doublement chargés (comme le  $^{136}\text{Ba}^{2+}$  sur le  $^{68}\text{Zn}^{+}$ ). Les effets de matrice non-spectraux sont eux associés à des changements de sensibilité et de rapports isotopiques mesurés dûs à la présence d'autres éléments dans l'échantillon. Dans notre cas, nous nous focaliserons sur les effets de matrice non-spectraux. En effet, certains effets spectraux sont en général assez facilement détectables pendant la phase de réglage de l'appareil en scannant les masses susceptibles de révéler les éléments perturbateurs (par exemple : la masse 60 pour le Ni, la masse 23 pour le Na ou la masse 136 pour le Ba) et dans les diagrammes tri-isotopiques pour le zinc (voire précédemment). Par contre, les effets de matrice non-spectraux (appelés par la suite uniquement effets de matrice) sont moins prévisibles et résultent principalement d'une séparation chimique non complète ou d'une perte de matière organique de la résine vers l'échantillon.

Ainsi, au cours de notre étude, des effets de matrice très visibles ont été observés à plusieurs reprises. Ils sont caractérisés par une variation très importante et aiguë des rapports isotopiques bruts mesurés. A une exception près, tous ces effets de matrice induisent une baisse des rapports isotopiques (isotopes lourds favorisés par rapport aux isotopes légers). Les séances du 10/06/08 (**Figure 29**) et du 04/07/08 (**Figure 20**) en sont de bons exemples.



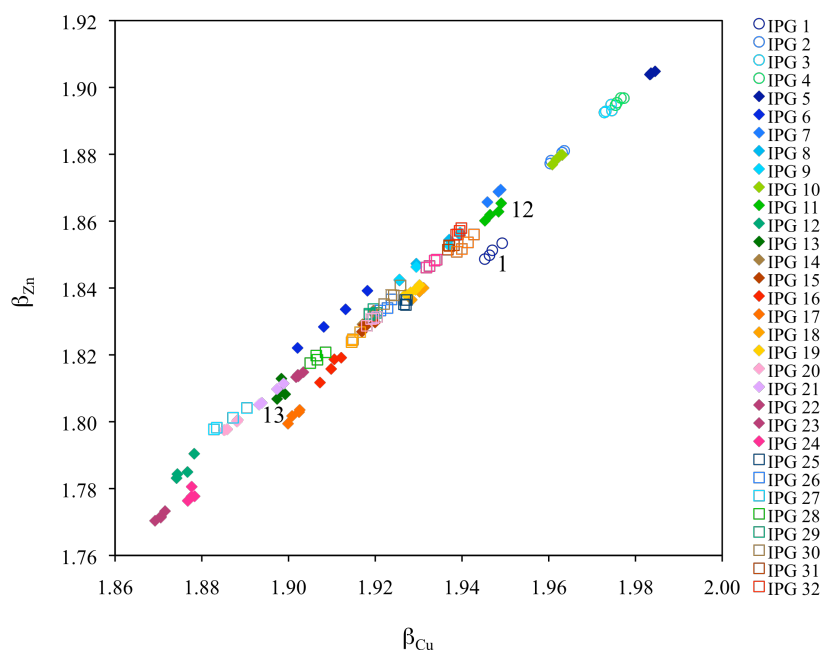
**Figure 29:** rapports bruts du cuivre et du zinc de solutions standards le 10 juin 2008 (un standard = quatre points de mesure)

Il est intéressant de remarquer que lors de la séance du 10/06/08, seuls deux standards (les quatre blocs de chaque standard sont représentés sur la **Figure 29** sont vraiment affectés par l'effet de matrice dû aux échantillons passés avant eux. Par la suite, les standards retrouvent des valeurs « pré-effet de matrice ». Par contre, le 04 juillet 08 (**Figure 20**), les standards sont durablement affectés et la valeur des rapports bruts des standards, aussi bien du cuivre que du zinc, reste plus faible jusqu'à l'arrêt du plasma. Cette différence est probablement due à deux éléments déclencheurs différents pour ces effets de matrice. Archer et al.<sup>16</sup> ont aussi observé des baisses importantes des valeurs de rapports isotopiques des standards de Cu et de Zn après le passage d'échantillons. Étonnament, dans leur étude, ces variations importantes sont visibles lorsque les échantillons sont passés sur colonnes et les standards n'ont pas été traités et n'apparaissent pas lorsque des standards passés sur colonnes sont mesurés entre chaque échantillon. Les standards passés sur colonnes sont initialement déjà purs mais le passage sur colonnes semble modifier la matrice. Ce biais pourrait donc être attribué à des impuretés provenant des colonnes qui viennent légèrement modifier la matrice de l'échantillon ou du standard élué sur la colonne.



**Figure 30:** Rapports bruts des standards du cuivre et du zinc mesurés le 30 mai 2008

Des effets plus subtiles sont aussi observables comme par exemple lors de la séance du 30/05/08 (**Figure 30**). Les rapports isotopiques sont assez chaotiques, c'est à dire ni stables, ni avec des effets de matrice très visibles. La droite des  $\beta$  est détaillée sur la **Figure 31**. Le premier standard, qui semble suivre la même tendance que les suivants en rapports bruts (**Figure 30**), ne s'aligne pas sur la droite des  $\beta$  des autres standards de la même séquence (**Figure 31**). A l'inverse, les standards 12 et 13 sont relativement bien alignés avec les standards précédents alors que leurs rapports bruts sont beaucoup plus faibles que ceux des précédents.



**Figure 31:** Droite des  $\beta$  détaillée le 30 mai 2008

Si l'on considère que cela correspond à de petits effets de matrice, on remarque que le cuivre et le zinc peuvent avoir des comportements isotopiques différents vis à vis de la perturbation apportée. Effectivement, si le cuivre et le zinc avaient le même comportement physico-chimique (du point de vue de leur transfert dans le plasma puis dans le MC-ICP-MS) vis à vis d'un élément perturbateur (élément ajouté, matière organique, etc...), cela ne modifierait pas l'équation décrivant la droite des betas et ne changerait pas la correction de discrimination de masse. Par contre, s'ils n'ont pas le même comportement, cela décalera les droites de  $\beta$ , compliquant d'autant la correction de masse.

#### 4.8. Modification de la matrice par dopage

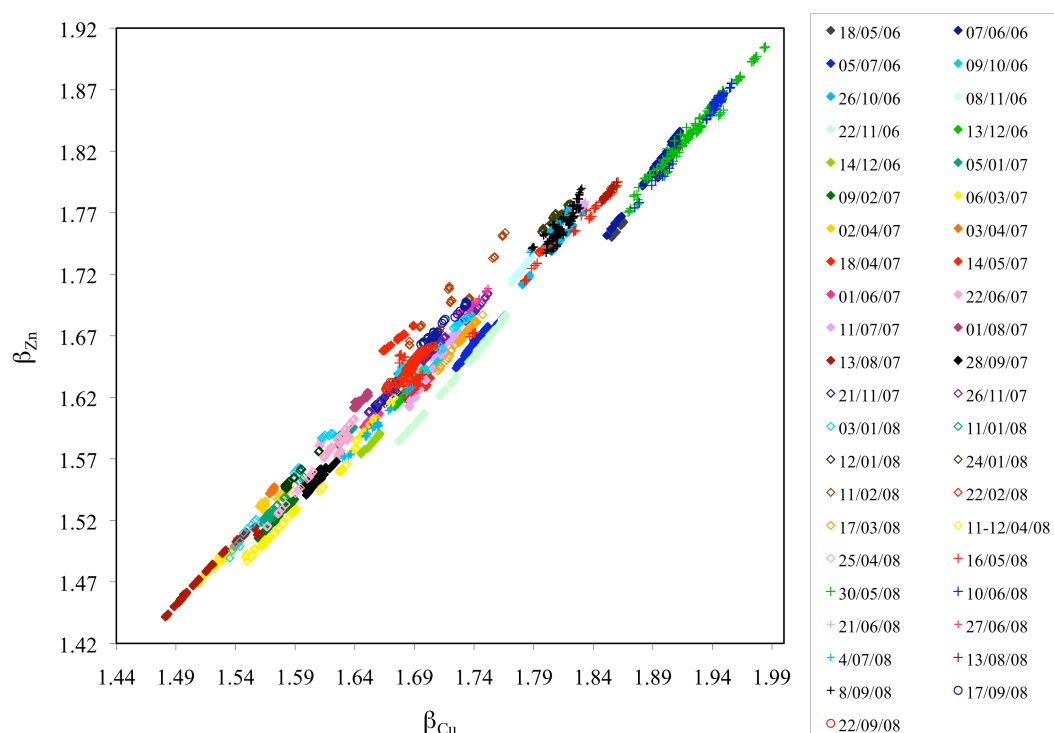
Dans le cas du cuivre et du zinc, Archer et al.<sup>16</sup> et Peel et al.<sup>27</sup> ont étudié l'influence d'éléments dopants pour la discrimination de masse, le but étant d'élargir la gamme de variation du biais de masse au cours d'une session de mesure. Ainsi, d'après Archer et al.<sup>16</sup>, l'ajout de fer dans des standards de cuivre et de zinc provoque une dégradation de la régression linéaire alors que l'ajout de strontium ne dégrade en rien la régression linéaire et augmente l'extension de la droite. Cependant, ces travaux sont contredits par les résultats de Peel et al.<sup>27</sup> ayant aussi travaillé sur l'ajout d'éléments dopants : strontium, plomb et uranium.

Lors de l'ajout de strontium par Peel et al.<sup>27</sup>, les standards dopés ne suivent plus de régression linéaire, tout à fait en contradiction avec Archer et al.<sup>16</sup>. Les instruments et systèmes d'introduction utilisés étant rigoureusement les mêmes pour ces deux études, Peel et al.<sup>27</sup> attribuent cette contradiction à des différences de réglages expérimentaux. Le plomb et l'uranium provoquent tous deux un allongement de la régression linéaire. Peel et al.<sup>27</sup> choisissent le plomb comme élément dopant de choix car le facteur de corrélation de la régression est similaire à celui des standards non dopés. Cependant, les droites des standards dopés et non-dopés ne sont pas comparées à l'échelle d'une même session, et en particulier la modification des coefficients directeurs des droites qui servent habituellement aux corrections de discrimination de masse.

L'utilisation d'éléments dopants pour la mesure du cuivre et du zinc peut être intéressante pour accroître la variation de la discrimination de masse lors d'une session de mesure. Cependant, de nombreux travaux doivent encore être réalisés. D'après les contradictions de Peel et al.<sup>27</sup> et de Archer et al.<sup>16</sup>, cette approche semble très dépendante des conditions expérimentales, qui varient d'une session à l'autre et donc rendra difficile la mise au point d'une méthode reconnue et universelle. L'amélioration de la séparation chimique nous semble être indispensable pour l'amélioration de la détermination des rapports isotopiques du cuivre et du zinc.

#### 4.9. Evolution des standards sur 3 ans

La **Figure 32** présente les droites des  $\beta$  pour tous les standards passés au cours de cette thèse. La variation sur les  $\beta_{\text{Cu}}$  est de 0,5 et sur les  $\beta_{\text{Zn}}$  de 0,46, ce qui représente une variation importante de discrimination de masse pour un même standard. Cependant, ce graphique correspond à trois ans de mesure avec des réparations conséquentes du MC-ICP-MS et le passage d'échantillons très variés, des réglages à chaque session différents et deux systèmes d'introduction différents.



**Figure 32:** droites des  $\beta$  pour l'ensemble des solutions standard IPG mesurées au cours de cette étude

Les mesures isotopiques du cuivre et du zinc sont maintenant devenues fiables et font l'objet de nombreuses publications. Cependant, un certain nombre de questions restent en suspens. Les causes de la discrimination de masse au sein d'un MC-ICP-MS ne sont pas encore complètement connues, ne peuvent donc pas être parfaitement corrigées et nuisent à la précision des données. Comme rappelé par Chen et al.<sup>17</sup>, de probables effets de matrice semblent être aussi la cause d'une dégradation de la qualité des mesures malgré l'utilisation de protocoles fiables. De plus, ironiquement, l'amélioration des techniques de mesure pouvant rendre la discrimination de masse trop stable à l'échelle d'une session, des essais d'ajout de dopants ont été réalisés pour augmenter la variation de discrimination de masse<sup>16, 27</sup>. Cependant, les premiers résultats semblent beaucoup trop dépendants des conditions de mesure pour permettre la mise au point d'une méthode universelle. D'autres tests doivent donc être réalisés, en particulier sur les différents systèmes d'introduction et leurs effets sur la correction de discrimination de masse. Par ailleurs, la purification des échantillons doit être améliorée et faire l'objet d'autres développements.

## 5. Modélisation

La modélisation est nécessaire pour mieux appréhender les phénomènes ayant lieu au cours des expériences. Nous nous sommes focalisés ici sur le modèle NICA-Donnan<sup>34</sup> inclut dans le code ECOSAT, qui sert à décrire la complexation des ions par les substances humiques ainsi que sur le code FLUXY, qui décrit les flux de métaux à travers des interfaces biologiques en présence de ligands. Le modèle NICA-Donnan est composé de deux parties : d'un côté, un modèle de type Donnan<sup>35</sup> est utilisé pour décrire le comportement électrostatique des substances humiques alors que de l'autre côté, le modèle NICA<sup>36, 37</sup> (Non-Ideal Competitive Adsorption) détaillera les interactions spécifiques des substances humiques avec les différents ions et les effets de compétition entre les différents ions.

### 5.1. Le modèle électrostatique de Donnan

Dans le cadre du modèle de Donnan<sup>35</sup>, la macro-molécule (acide humique ou fulvique) est assimilée à un gel de volume variable  $V_D$ . Ce volume de donnan dépendra principalement de la force ionique de la solution. Les charges négatives de la macro-molécule sont réparties sur l'ensemble du gel et ne seront plus considérées que comme une seule charge distribuée de manière homogène. Cette charge globale est neutralisée par des cations à l'intérieur du volume de Donnan selon l'équation suivante :

$$\frac{Q_{tot}}{V_D} = \sum z_i (c_i - c_{Di}) \quad (20)$$

avec  $Q_{tot}$  la charge totale de la molécule organique,  $V_D$  le volume de Donnan,  $Z_i$  la charge de l'ion,  $c_i$  la concentration dans la solution et  $c_{Di}$  la concentration dans le volume de Donnan.

Il n'est pas possible de mesurer directement ce volume de Donnan mais Benedetti et al.<sup>35</sup> ont montré que le volume de Donnan est lié à la force ionique selon la relation empirique suivante :

$$\log(V_D) = b(1 - \log I) - 1 \quad (21)$$

où  $I$  est la force ionique de la solution et  $b$  un paramètre empirique propre au ligand variant entre -0.3 et -0.5 pour les acides humiques et entre -0.7 et -0.9 pour les acides fulviques.

## 5.2. Modèle NICA

Le modèle NICA<sup>38</sup> dépeint la complexation spécifique des protons et des cations sur les substances humiques en tenant compte de l'hétérogénéité des celles-ci et de la compétition entre les différents ions.

Lors des titrages acide/base, où l'on mesure l'évolution de la charge  $Q_{\text{tot}}$  en fonction du pH, la courbe décrite est très régulière, sans changement de pente brusque, ce qui indique aussi un très grand nombre de sites qui se déprotonent au fur et à mesure de l'augmentation du pH. Pour correctement modéliser ce comportement des substances humiques, le modèle NICA est fondé sur une description continue de la distribution des sites de complexation.

La quantité  $Q_i$  d'ions  $i$  complexés sur une substance humique est exprimée dans le cadre du modèle NICA<sup>37</sup> par :

$$Q_i = \frac{n_{i,1}}{n_{H,1}} \times Q_{\max H,1} \frac{(\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}}}{\sum_i (\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}}} \times \frac{\left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}} \right]^{p_1}}{1 + \left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,1} c_i)^{n_{i,1}} \right]^{p_1}} + \frac{n_{i,2}}{n_{H,2}} \times Q_{\max H,2} \frac{(\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}}}{\sum_i (\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}}} \times \frac{\left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}} \right]^{p_2}}{1 + \left[ \sum_i (\tilde{K}_{i,2} c_i)^{n_{i,2}} \right]^{p_2}}$$

Les numéros 1 et 2 correspondent à deux types de sites réactionnels dits de basse et haute affinité pour les protons. Ils correspondent à des groupements de type carboxylique (basse affinité) et de type phénolique (haute affinité) selon leur valeur de  $\tilde{K}_H$ . Ces distributions sont cependant suffisamment larges pour englober également d'autres types de groupements complexants comme par exemple des groupements sulfurés, amines...

$Q_{\max}$  correspond à la capacité maximale d'adsorption des protons sur un type de sites (basse ou haute affinité).  $n_i$  est un paramètre de non-idéalité spécifique à chaque ion  $i$ , il varie de 0 à 1, 1 étant la valeur idéale.  $c_i$  est la concentration de l'ion  $i$  à la surface de la substance humique.  $p$  est la largeur de la distribution pour chaque type de site et  $\tilde{K}_i$  la valeur médiane de la position de la distribution pour chaque type de site.

Ainsi, les paramètres essentiels pour une description efficace de la complexation d'un ion avec une substance humique via NICA sont :

➔ Les deux paramètres  $Q_{\max,1}$  et  $Q_{\max,2}$  qui représentent la densité maximale de sites sur la substance humique pour chaque distribution



- ➔ Les deux paramètres  $p_1$  et  $p_2$ , correspondant aux largeurs des distributions de chaque type de site, sont caractéristiques de l'hétérogénéité intrinsèque de la substance humique étudiée.
- ➔ Les paramètres spécifiques du proton :  $\tilde{K}_{H1}$ ,  $\tilde{K}_{H2}$ ,  $n_{H1}$  et  $n_{H2}$  décrivant la valeur médiane des affinités pour chaque type de site et la non-idéalité du proton pour chaque distribution.
- ➔ Les paramètres spécifiques du cation considéré :  $\tilde{K}_{M1}$ ,  $\tilde{K}_{M2}$ ,  $n_{M1}$  et  $n_{M2}$  avec les mêmes définitions que précédemment.
- ➔ Le paramètre  $b$  du modèle de Donnan est aussi caractéristique de la substance humique, complète sa description et permet le calcul de la concentration de l'ion à la surface de la substance humique.

Tous les paramètres caractéristiques de la substance humique considérée et de la complexation du proton sont déterminés par titrage acide/base de la substance humique à différentes forces ioniques. Pour les paramètres spécifiques à chaque élément, il est nécessaire de réaliser des isothermes pour chaque élément. Cela consiste à mesurer la quantité d'élément complexé à la substance humique avec une quantité totale d'élément variable et à différents pHs. Ces différents paramètres étant déterminés par ajustement sur les données expérimentales, il est nécessaire d'avoir le plus de données possible pour avoir les paramètres les plus fiables possible.

Ainsi, la substance humique utilisée dans le chapitre 3 est un acide humique sur lequel de nombreuses études ont été réalisées<sup>34, 35, 37, 39-42</sup> et dont les paramètres sont bien connus. Ceux-ci peuvent être trouvés dans le **Tableau 12**.

		1	2
Acide Humique	B	0,49	
	$Q_{\max}$	2,03	3,54
Proton	$K_H$	2,93	8,00
	$n_H$	0,50	0,26
Zinc	$K_{Zn}$	0,11	2,39
	$n_{Zn}$	0,67	0,27

**Tableau 12:** Paramètres du modèle NICA-Donnan utilisés dans le Chapitre 3<sup>42,48</sup>

Le code comprenant le modèle NICA-Donnan utilisé au cours de cette étude est le code ECOSAT. Ce code est aussi utilisé pour décrire des systèmes complexes comme les sols et

comprend d'autres modèles pour tenir compte de l'effet des autres composants (oxydes de fer, argiles,...). Ce code a été utilisé aussi bien : i) pour des expériences de complexation du zinc avec un acide humique (Chapitre 3), ii) pour modéliser la spéciation du zinc dans la Seine (Chapitre 3) ou dans une solution hydroponique adaptée pour la croissance de plantes (Chapitre 4), iii) pour modéliser la spéciation du zinc dans un sol pollué en zinc (Chapitre 3) ou dans des sols agricoles plus ou moins pollués en cuivre (Chapitre 5).

### 5.3. FLUXY

Le code FLUXY calcule les flux de métaux vers une interface biologique dans un système aquatique en présence de ligands<sup>43</sup>. Le flux à l'interface entre un organisme et une solution dépend en général des cinétiques i) de l'absorption du métal à l'interface (défini par un paramètre d'internalisation  $k_{int}$ ) et ii) des processus de diffusion/réaction dans la solution. Quand le taux d'internalisation est petit comparé à ceux des processus de diffusion/réaction, on aboutit au modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model ou Biotic Ligand Model) où seul le métal libre contribue au flux entrant dans l'organisme et où la solution n'est pas perturbée. Ce flux correspond à un flux minimum. A l'autre extrémité, quand le taux d'internalisation est très grand devant ceux des processus de diffusion/réaction, ces processus deviennent l'étape cinétiquement limitante et un flux maximum est atteint. Dans ce cas, le flux est contrôlé par les propriétés physico-chimiques et hydrodynamiques du milieu extérieur et ce flux sera le même pour tous les organismes ayant la même géométrie. Même si, pendant longtemps, la théorie de l'ion libre semblait la théorie la plus adaptée pour le prélèvement des métaux dans les plantes et était la plus utilisée, les processus de diffusion/réaction ne peuvent pas toujours être négligés<sup>44-46</sup> et peuvent être dominants dans les conditions naturelles de déficience en métaux. Dans FLUXY, le flux calculé correspond au flux maximum.

FLUXY est basé sur la résolution analytique des équations de diffusion/réaction avec un nombre illimité de complexes dont les constantes de réactions et les coefficients de diffusion couvrent une très large gamme. En revanche, la résolution de ces équations n'est valide que lorsque le ligand est en excès par rapport au métal. Deux modes de calculs sont possibles. Le premier, FLUXY-RS, est basé sur une résolution rigoureuse des équations mais n'est valide que pour les complexes avec un métal et un ligand ML. Le second, FLUXY-RLA, se base sur une approximation (Reaction-Layer Approximation) qui peut être appliquée successivement

aux complexes  $ML_n$ . Il suffit que tous les complexes  $ML_n$  ( $n > 1$ ) soient en équilibre avec  $ML$ , ce qui est souvent le cas avec les ligands simples. La dissociation de ces différents complexes n'a lieu que dans la couche de réaction. Dans notre cas, seul le flux RLA est considéré.

Dans FLUXY, les principales hypothèses sont donc :

- Seul le métal libre peut traverser la membrane et être absorbé par l'organisme biologique considéré.
- Le métal compris dans un complexe peut participer au flux mais seulement après sa dissociation dans la solution, ceci selon le degré de labilité du ligand.
- Le ligand est en excès par rapport au métal considéré.
- Dans la solution au delà de la couche de diffusion à proximité de l'organisme, la concentration de toutes les espèces est supposée homogène.
- La surface biologique absorbe les métaux suivant une cinétique Michaelis-Menten. Le flux de métal est donc proportionnel à la concentration de sites de transfert à la surface de l'organisme, à la constante de complexation du métal avec ces sites ( $K_a$  en  $(\text{mol.L}^{-1})^{-1}$ ) et au taux d'internalisation ( $k_{\text{int}}$  en  $\text{s}^{-1}$ ). Ces deux derniers paramètres sont à mettre en parallèle avec la constante de Michaelis  $K_M$  (en  $\text{mol.L}^{-1}$ ) et le flux initial maximum  $F_{\text{max}}$  ( $\text{mol Cu.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) de l'équation de Michaelis-Menten<sup>47</sup> :

$$F_{\text{uptake}} = \frac{F_{\text{max}} \times [Cu^{2+}]}{K_M + [Cu^{2+}]}$$

La constante de complexation  $K_a$  est donc liée à la constante de Michaelis par la simple

réaction :  $K_a = \frac{1}{K_M}$

Les paramètres pouvant être modifié sont donc la composition de la solution étudiée (pH, force ionique, concentrations des différents ions et ligands), les coefficients de diffusion des ions, des ligands et des différents complexes, de la température, l'épaisseur de la couche de diffusion, la vitesse d'internalisation  $k_{\text{int}}$ , la constante de complexation  $K_a$ , la concentration en sites, le volume de la solution considérée, le nombre de micro-organismes, leur géométrie (plane ou sphérique) et leur rayon s'ils sont sphériques. Pour chaque ion, le coefficient de diffusion (en  $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$ ) ainsi que la constante de déshydratation ( $k_w$  en  $\text{s}^{-1}$ ) peuvent être modifiés.

## References

1. Temminghoff E. J. M.; Plette A. C. C.; Van Eck R.; Van Riemsdijk W. H., Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan Membrane Technique. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 417, 149-157.
2. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Van Riemsdijk W. H., Determination of the free ion concentration of trace metals in soil solution using a soil column Donnan membrane technique. *European Journal of Soil Science* **2001**, 52, 629-637.
3. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Van Riemsdijk W. H., Contribution of individual sorbents to the control of heavy metal activity in sandy soil. *Environmental Science and Technology* **2001**, 35 (22), 4436-4443.
4. Oste L. A.; Temminghoff E. J. M.; Lexmond T. M.; Van Riemsdijk W. H., Measuring and modeling zinc and cadmium binding by humic acid. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 856-862.
5. Cancès B.; Ponthieu M.; Castrec-Rouelle M.; Aubry E.; Benedetti M. F., Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* **2003**, 113, 341-355.
6. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; van Riemsdijk W. H., Aluminium speciation in natural waters: measurement using Donnan membrane technique and modeling using NICA-Donnan. *Water Research* **2002**, 36, 4215-4226.
7. Ma H. Z.; Kim S. D.; Cha D. K.; Allen H. E., Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1999**, 18, 828-837.
8. Juillot F.; Maréchal C.; Ponthieu M.; Cacaly S.; Morin G.; Benedetti M.; Hazemann J.L.; Proux O.; Guyot F., Zn isotopic fractionation caused by sorption on goethite and 2-Lines ferrihydrite. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 4886-4900.
9. Sivry Y.; Riotte J.; Dupré B., Study of exchangeable metal on colloidal humic acids and particulate matter by coupling ultrafiltration and isotopic tracers: Application to natural waters. *Journal of Geochemical Exploration* **2006**, 88, 144-147.
10. Balistrieri L. S.; Borrock D. M.; Wanty R. B.; Ridley W. I., Fractionation of Cu and Zn isotopes during adsorption onto amorphous Fe(III) oxyhydroxide: Experimental mixing of acid rock drainage and ambient river water. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 311-328.
11. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Emnova E. E.; Kompantseva E. I.; Freydier R., Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hyd)oxides: Possible structural control. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 1742-1757.

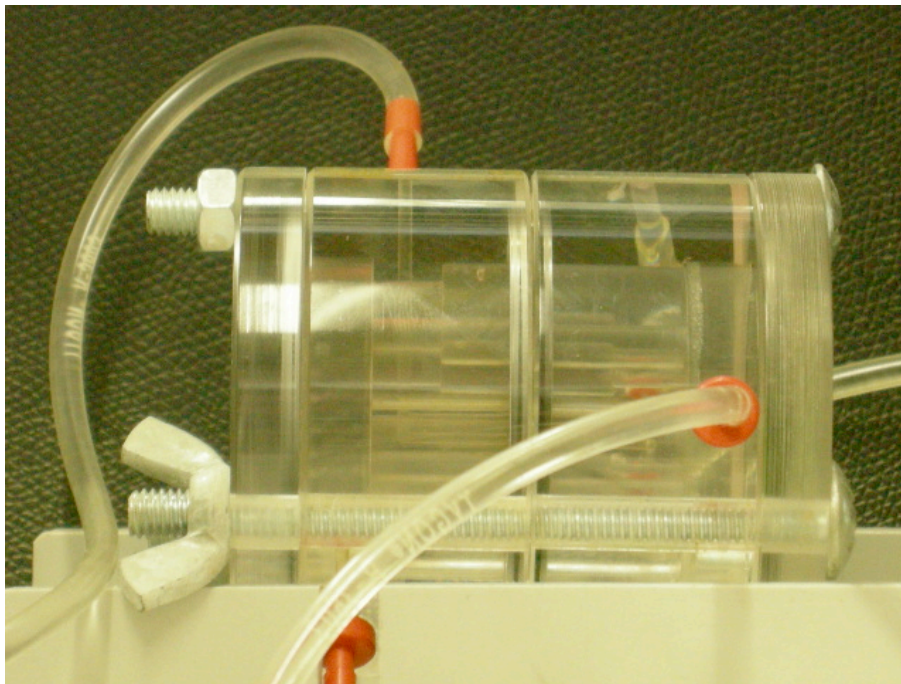
12. Gélabert A.; Pokrovsky O. S.; Viers J.; Schott J.; Boudou A.; Feurtet-Mazel A., Interaction between zinc and freshwater and marine diatom species : Surface complexation and Zn isotope fractionation. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, 70, 839-857.
13. Maréchal C. N.; Télouk P.; Albarède F., Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* **1999**, 156, 251-273.
14. Borrok D. M.; Nimick D. A.; Wanty R. B.; Ridley W. I., Isotopic variations of dissolved copper and zinc in stream waters affected by historical mining. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72 (2), 329-344.
15. Borrok D. M.; Wanty R. B.; Ridley W. I.; Wolf R.; Lamothe P. J.; Adams M., Separation of copper, iron, and zinc from complex aqueous solutions for isotopic measurement. *Chemical geology* **2007**, 242 (3-4), 400-414.
16. Archer C.; Vance D., Mass discrimination correction in multiple-collector plasma source mass spectrometry: an example using Cu and Zn isotopes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19 (656-665).
17. Chen J.; Louvat P.; Gaillardet J.; Birck J-L., Direct separation of Zn from dilute aqueous solutions for isotope composition determination using multi-collector ICP-MS. *Chemical Geology* **2008**, *In press*.
18. Andrén H.; Rodushkin I.; Stenberg A.; Malinovsky D.; Baxter D. C., Sources of mass bias and isotope ratio variation in multi-collector ICP-MS: optimization of instrumental parameters based on experimental observations. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19, 1217-1224.
19. Douglas D. J.; French J. B., Gas dynamics of the inductively coupled mass spectrometry interface. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1988**, 3, 743-747.
20. Niu H.; Houk R. S., Fundamental aspects of ion extraction in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* **1996**, 51, 779-815.
21. Heumann K. G.; Gallus S. M.; Rädlinger G.; Vogl J., Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1998**, 13, 1001-1008.
22. Albarède F.; Beard B. L., Analytical methods for non-traditional isotopes. In *Geochemistry of non-traditional stable isotopes*, Johnson C. M.; Beard B. L.; Albarède F., Eds. Mineralogical Society of America Geochemical Society: 2004; Vol. 55, pp 113-152.
23. Baxter D. C.; Rodushkin I.; Engstrom E.; Malinovski D., Revised exponential model for mass bias correction using an internal standard for isotope abundance ratio measurements by multi-collector inductively coupled mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2006**, 21, 427-430.
24. Albarède F.; Telouk P.; Blichert-Toft J.; Boyet M.; Agranier A.; Nelson B., Precise and accurate isotopic measurements using multi-collector ICPMS. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2004**, 68, 2725-2744.

25. Zhu X. K.; O'Nions R. K.; Guo Y.; Belshaw N. S.; Rickard D., Determination of natural Cu-isotope variation by plasma-source mass spectrometry: implications for use as geochemical tracers. *Chemical Geology* **2000**, *163*, 139-149.
26. Zhu Z. K.; Guo Y.; Williams R. J. P.; O'Nions R.K.; Matthews A.; Belshaw N. S.; Canters G. W.; de Waal E. C.; Weser U.; Burgess B. K.; Salvato B., Mass fractionation processes of transition metal isotopes. *Earth and Planetary Science Letters* **2002**, *200*, 47-62.
27. Peel K.; Weiss D.; Chapman J.; Arnold T.; Coles B., A simple combined sample-standard bracketing and inter-element correction procedure for accurate mass bias correction and precise Zn and Cu isotope ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2008**, *23*, 103-110.
28. Mason T. F. D.; Weiss D.; Horstwood M.; Parrish R. R.; Russell S. S.; Mullane E.; Coles B. J., High-precision Cu and Zn isotope analysis by plasma source mass spectrometry. Part 2. Correcting for mass discrimination effects. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 218-226.
29. Hirata T., Lead isotopic analyses of NIST standard reference materials using multi collector inductively coupled mass spectrometry coupled with a modified external correction method for mass discrimination effect. *The Analyst* **1996**, *121*, 1407-1411.
30. Cloquet C.; Carignan J.; Lehmann M. F.; Vanhaecke F., Variation in the isotopic composition of zinc in the natural environment and the use of zinc isotopes in biogeosciences: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 451-463.
31. Barling J.; Weis D., Influence of non-spectral matrix effects on the accuracy of Pb isotope ratio measurement by MC-ICP-MS: implications for the external normalization method of instrumental mass bias correction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2008**, *23*, 1017-1025.
32. Woodhead J., A simple method for obtaining highly accurate Pb isotope data by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, *17*, 1381-1385.
33. Schoenberg R.; Von Blanckenburg F., An assessment of the accuracy of stable Fe isotope ratio measurements on samples with organic and inorganic matrices by high-resolution multicollector ICP-MS. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *242*, 257-272.
34. Kinniburgh D. G.; Milne C. J.; Benedetti M. F.; Pinheiro J. P.; Filius J.; Koopal L. K.; Van Riemsdijk W. H., Metal ion binding by humic acid: Application of the NICA-Donnan model. *Environmental Science and Technology* **1996**, *30*, 1687-1698.
35. Benedetti M. F.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Humic substances considered as a heterogeneous Donnan gel phase. *Environmental Science and Technology* **1996a**, *30*, 1805-1813.
36. Koopal L. K.; Van Riemsdijk W. H.; De Wit J. C. M.; Benedetti M. F., Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, *166*, 51-60.

37. Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Borkovec M.; Benedetti M. F.; Avena M. J., Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and Surfaces* **1999**, *151*, 147-166.
38. Benedetti M. F.; Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Metal ion binding to humic substances: application of the non-ideal competitive adsorption model. *Environmental Science and Technology* **1995**, *29*, 446-457.
39. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; De Wit J. C. M.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic acid. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1995**, *59* (6), 1101-1112.
40. Benedetti M. F.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Kinniburgh D. G.; Goody D. C.; Milne C. J., Metal binding by natural organic matter: from the model to the field. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1996b**, *60*, 2503-2513.
41. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Tipping E., Generic NICA-Donnan parameters for proton binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* **2001**, *35*, 2049-2059.
42. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Tipping E., Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* **2003**, *37*, 958-971.
43. Zhang Z.; Buffle J.; Startchev K.; Alemani D., Fluxy: A simple code for computing steady-state metal fluxes at consuming (bio)interfaces, in natural waters. *Environmental Chemistry* **2008**, *5*, 204-217.
44. Parker D. R.; Pedler J. F., Reevaluating the free-ion activity model of trace metal availability to higher plants. *Plant and Soil* **1997**, *196*, 223-228.
45. Degryse F.; Smolders E.; Parker D. R., Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant and Soil* **2006**, *289*, 171-185.
46. Wang P.; Zhou D. M.; Luo X. S.; Li L. Z., Effects of Zn-complexes on zinc uptake by wheat (*Triticum aestivum*) roots: a comprehensive consideration of physical, chemical and biological processes on bio-uptake. *Plant and Soil* **2009**, *316*, 177-192.
47. Bravin M. Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole. INRA - Montpellier SupAgro, Montpellier, **2008**.
48. Oste L. A.; Temminghoff E. J. M.; Lexmond T. M.; Van Riemsdijk W. H., Measuring and modeling zinc and cadmium binding by humic acid. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 856-862.

## Chapitre III

Zinc isotopic fractionation :  
why organic matters







# Fractionnement isotopique du Zn avec un acide humique

Soumis à Environmental Science & Technology

## Résumé

Le fractionnement isotopique du zinc pendant son adsorption sur un acide humique, considéré comme un analogue de la matière organique, a été étudié expérimentalement en fonction du pH et ce, pour la première fois. La Donnan Membrane technique (DM) est utilisée pour séparer le zinc complexé à un acide humique PHA (Purified Humic Acid) du zinc libre en solution ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Cette technique a été adaptée avec succès pour la réalisation de mesures isotopiques (pas de fractionnement isotopique dû au système seul) et permet la mesure des rapports isotopiques du zinc libre  $\text{Zn}^{2+}$ .

A pH inférieur à 6, la complexation du zinc avec l'acide humique ne peut être associée à aucun fractionnement isotopique alors qu'au delà de pH 6, un enrichissement significatif en isotopes lourds du zinc complexé à l'acide humique a pu être observé ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PHA-Solution}} = +0.24 \text{ ‰} \pm 0.06 \text{ } 2\sigma$ ). La complexation du zinc avec l'acide humique peut être décrite à l'aide de deux types de sites : des sites de haute et de basse affinité. Le fractionnement isotopique observé résulte d'une hausse du taux de complexation sur l'acide humique avec le pH et d'un changement des proportions de complexation sur les deux types de site. L'enrichissement en isotopes lourds sur l'acide humique peut être associé à des constantes de complexation plus élevées et des longueurs de liaisons plus courtes par rapport au zinc en solution. Par bilan de masse, les coefficients de fractionnement sont de 1.0004 pour les sites de haute affinité et de 1.0000 pour les sites de basse affinité.

Le fractionnement isotopique du zinc complexé à la matière organique varie donc en fonction du type de matière organique et de ses proportions de sites de haute et basse affinité. Le modèle NICA-Donnan, avec les coefficients de fractionnement déterminés dans cette étude et

les  $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissous}}$  mesurés dans la Seine, par Chen et al.<sup>1</sup>, a été utilisé pour déterminer la composition isotopique du zinc libre dans la Seine. Le  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissous-Zn}^{2+}}$  est variable (entre +0.02 ‰ et +0.18 ‰), selon la proportion d'acide humique, possédant en moyenne plus de HAS, et d'acide fulviques, possédant moins de HAS, considérée dans la matière organique. Cette étude permet une meilleure compréhension des mécanismes associés à la complexation du zinc avec la matière organique.

## Zinc isotopic fractionation: why organic matters

Delphine Jouvin<sup>1,2\*</sup>, Pascale Louvat<sup>2</sup>, Farid Juillot<sup>3</sup>, Chloé N. Maréchal<sup>4</sup> and Marc F. Benedetti<sup>1</sup>

(1) Équipe de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot – Institut de Physique du Globe de Paris, Batiment Lamarck, 75205 Paris cedex 13, France

(2) Équipe de Géochimie et Cosmochimie, Université Paris Diderot – Institut de Physique du Globe de Paris, 2 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

(3) Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux condensés, Université Pierre et Marie Curie – Université Paris Diderot – Institut de Physique du Globe de Paris, 140 rue de Lourmel, 75015 Paris, France

(4) Unité de Formation et de Recherche de Sciences de la Terre, Université Lyon 1, 2 rue Dubois, 69622 Villeurbanne cedex, France

\*Corresponding author: [jouvin@ipgp.jussieu.fr](mailto:jouvin@ipgp.jussieu.fr)

## Abstract

Zinc isotopic fractionation during adsorption onto a purified humic acid (PHA), an analogue of organic matter (OM), has been investigated experimentally as function of pH. The Donnan Membrane device (DM) was used to separate Zn bound to the PHA from free  $\text{Zn}^{2+}$  ions in solution and successfully adapted for isotopic measurements, allowing the measurement of isotopic ratios of free  $\text{Zn}^{2+}$ . Below pH 6, adsorption of Zn on the PHA resulted in no measurable isotopic fractionation, while at higher pH, Zn bound to PHA was heavier ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PHA-FreeZn}} = +0.24 \text{ ‰} \pm 0.06 \text{ } 2\sigma$ ). The isotopic variations can be explained by changes in Zn speciation with pH, with higher complexation constants and shorter bond lengths for Zn-PHA complex compared to the aqueous free Zn. Complexation of Zn with PHA occurred mostly through binding with high affinity sites (HAS) and low affinity sites (LAS). Fractionation factors determined by mass balance calculations were equal to 1.0004 for HAS and 1.0000 for LAS.  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{OM-FreeZn}}$  varied then according to the heterogeneous nature of the OM, because of the variable relative proportion of these two types of site. The NICA-Donnan model, along with these fractionation factors and the  $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissolved}}$  was used to simulate the corresponding isotopic composition of free Zn in the Seine river, France. The  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissolved-freeZn}^{2+}}$  values obtained varied from +0.02 ‰ to +0.18 ‰, depending on the amount of HAS and LAS assumed for the OM. This study allowed a better understanding of Zn isotope fractionation mechanisms associated with organic matter binding.

## 1. Introduction

The understanding of Zn isotopic ratios in the environment depends on their quantification in the various compartments and materials on earth and on the isotopic fractionation during the biogeochemical processes driving Zn speciation. Few laboratory experiments have been conducted to quantify these isotopic fractionations driven by biogeochemical reactions. Adsorption and absorption of Zn by organic materials and reactions with (hydr)oxides were conducted<sup>2-9</sup>. Gélabert et al.<sup>2</sup> studied diatoms species and measured an enrichment of heavy isotopes in the cells compared to their growth media. John et al.<sup>3</sup> reported similar results when diatoms cells were unwashed while they obtained opposite results when only absorption was taken into account. During Zn uptake by plants, Weiss et al.<sup>4</sup> and Moynier et al.<sup>5</sup> observed an enrichment of the heavier isotopes in the roots compared to the nutrient solution, followed by a depletion of heavy isotopes in the shoots compared to the roots. Other laboratory studies indicated that adsorption onto mineral lead to heavy isotopes enrichment on the mineral surfaces<sup>7-9</sup>.

Complexation by Organic Matter (OM) strongly influences Zn speciation, mobility and bioavailability<sup>10, 11</sup>. Humic acids are a significant fraction of OM<sup>10</sup>. The purpose of this study is to determine and understand Zn isotopic fractionation due to its complexation with a well-known Purified Humic Acid (PHA)<sup>12-16</sup>. Complexation with HA depends on pH, ionic strength and competition with other cations<sup>10</sup>. Experiments were conducted at fixed ionic strength and variable pH to obtain variable degrees of complexation, which were simulated with the NICA-Donnan model<sup>13, 15</sup>.

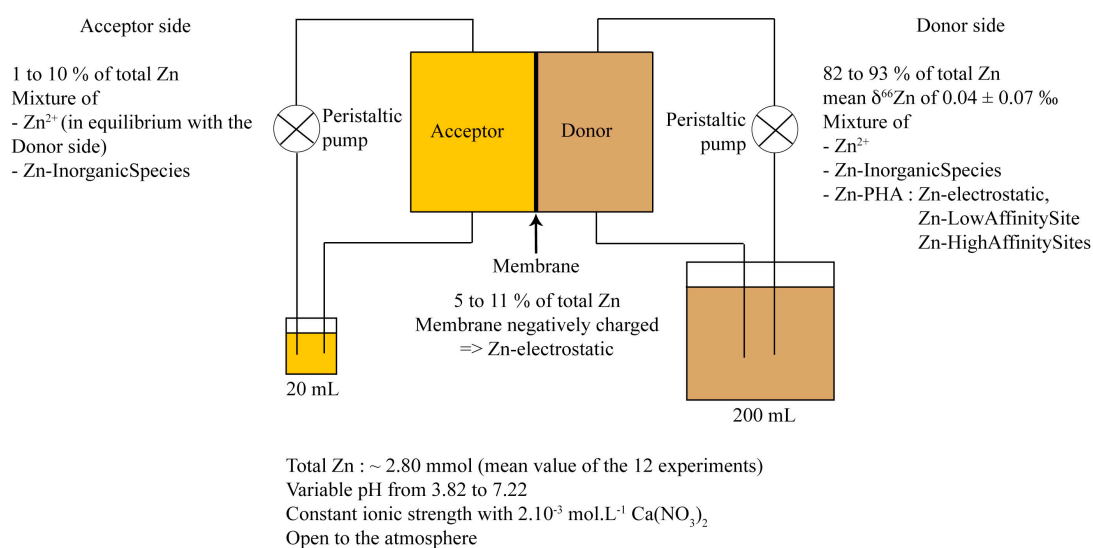
The major experimental challenge to study interaction of elements with OM is the separation of the fraction of Zn complexed to OM from that corresponding to free Zn<sup>2+</sup> ions. We used the Donnan Membrane technique (DM) developed by Temminghoff et al.<sup>17</sup> to separate free Zn ions and Zn bound to PHA. This separation device allowed the measurements of the isotopic composition of the different forms of Zn.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All reagents were prepared using 18.2 mΩ × cm Milli-Q water®. Supra pure nitric and hydrochloric acids, tetrahydrate-calcium nitrate ACS Proanalysis (Merck) were used during DM experiments. All chemical separations were realized with double-distilled acids. Zn and Cu used were AAS specpure standard solutions (Alfa Aesar) in HNO<sub>3</sub> matrix. PHA has been isolated according to Milne et al.<sup>12</sup> and PHA stock solution was stored at 4°C.

### 2.2. Donnan Membrane



**Figure 33:** Descriptive representation of the Donnan Membrane (DM) device used in this study to separate free Zn<sup>2+</sup> from Zn bound to PHA

The Donnan Membrane device<sup>17</sup> is sketched in Figure 33 and consists of a cation exchange membrane separating a donor and an acceptor solution. At the beginning of the experiment, the donor side contained the studied solution, (i.e. Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 mmol.L<sup>-1</sup>) with Zn and PHA,

and the acceptor side contained only the electrolyte solution. The membrane was negatively charged and only cations were able cross the membrane. Equilibration is attained when acceptor and donor sides had equal cation concentration. This equilibrium is reached in 2 to 3 days for divalent cations<sup>17, 18</sup>; for our experiments, it took less than 3 days (Figure S1 in Supporting Information). The donor side then contained a mixture of aqueous  $\text{Zn}^{2+}$ , Zn complexed to PHA and Zn in inorganic complexes, whereas only aqueous  $\text{Zn}^{2+}$  was present in the acceptor side. In this study, acceptor and donor sides had a volume of 20 mL and 200 mL, respectively. This difference ensured that Zn loss towards the acceptor side was limited compared to the total Zn in the donor side, and that, the chemical equilibrium in the donor side was not disturbed. Part of free Zn ions was bound to the membrane, the time needed for Zn to complex the membrane was much shorter than the time necessary to reach the donnan equilibrium. However the amount of Zn in the membrane was low enough to preserve the equilibrium in the donor side. The different parts of the system were washed. The membrane was rehydrated overnight, washed three times in  $\text{HNO}_3$  1 mol.L<sup>-1</sup> for at least 8 h and rinse with water after each acid wash. DM parts, Teflon vessels and connecting devices were washed twice in  $\text{HNO}_3$  1 mol.L<sup>-1</sup> and once in  $\text{HCl}$  0.5 mol.L<sup>-1</sup>. Before sorption experiments, the membrane was preconditioned in  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1 mol.L<sup>-1</sup> overnight and then in  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mmol.L<sup>-1</sup> for 2 h.

### 2.3 Methodology

A first set of experiments aimed at estimating the isotopic fractionation due to Zn adsorption on the membrane in absence of PHA. Three membranes were immersed in 50 mL of aqueous solution of Zn (total Zn content around 32.6  $\mu\text{mol}$ ). Three other membranes were immersed in 50mL of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mmol.L<sup>-1</sup> solution with Zn at similar concentration. After 3 days, aqueous and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  solutions were collected and membranes were washed three times in  $\text{HNO}_3$  1 mol.L<sup>-1</sup> (20 mL) or  $\text{HCl}$  2 mol.L<sup>-1</sup> (40 mL). Zn concentrations and isotopic compositions were measured for these solutions. The quantitative recovery of Zn from the membrane was checked.



In a second set of experiments, Zn isotopic fractionation of the entire DM system in absence of PHA was tested. The acceptor and donor sides were filled with  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mmol.L<sup>-1</sup> solution and Zn was added to the donor side (i.e. 2.80  $\mu\text{mol}$ , values detailed in Table 1). After three days, Zn concentrations were measured in acceptor and donor sides. Membranes were washed with HCl 2 mol.L<sup>-1</sup> overnight and Zn concentration and isotopic composition in the acid leach were determined.

In the third set of experiments, the same protocol was used but PHA was added in the donor side (~100 mg.L<sup>-1</sup> PHA). Before each experiment, the pH was adjusted by adding  $\text{HNO}_3$  or KOH in the donor solution. The maximum volume added was 0.6 mL. At the end of the experiments, the pH was recorded with a Hanna pH211 microprocessor pHmeter.

Dissolved organic carbon concentrations were measured with a Total Organic Carbon analyzer (Shimadzu) with a typical detection limit of 0.2 mg.L<sup>-1</sup> and a precision of 2 %. Zn and Ca concentrations were measured with a Flame Atomic Absorption Spectrometer Solaar Unicam. The detection limits are 0.5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  and 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  for Zn and Ca, respectively and the precision better than 2 %. An X Series 2 ICP-MS (Thermo®) was used for blank measurements with detection limits below 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  and standard deviation around 1%.

#### 2.4. MC-ICP-MS Zn isotopic analysis

Prior to Zn isotopic measurements, Zn was extracted from the sample solutions following a protocol<sup>9</sup> adapted from that of Maréchal et al.<sup>19</sup>. SPE columns (Poly-prep columns, 0.8 cm Ø × 4 cm long) and AG-MP-1 (200-400 mesh) resin from Biorad were used. After extraction, Zn and Cu concentrations were measured. Typical procedure blanks were below 15 ng for Zn and 1 ng for Cu. Cu standard was added to Zn samples for MC-ICP-MS mass bias correction. An aliquot of each sample was evaporated and taken up in a Cu standard solution of 1.57  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  in  $\text{HNO}_3$  0.05 mol.L<sup>-1</sup> to reach a final solution of 3.06  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  Zn and 1.57  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  Cu.

Samples were analyzed with a MC-ICP-MS Neptune (ThermoFinnigan) and an Apex HF introduction system. We used in-house standards calibrated<sup>20</sup> (AAS specpure standard

solutions Cu OC405617 and Zn OC469583 from Alfa Aesar). This Zn standard was also used during the DM experiments. Two samples were measured between two standards and one measurement lasted 14 minutes.

The instrumental mass bias correction used in this study (Cu-doping plus « loose » bracketing) is described in the SI. Isotopic compositions were expressed as:

$$\delta^{66}\text{Zn} = \left( \frac{\left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{sample}}}{\left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

Ten fractions of the same sample (with a matrix similar to that of our experiments) were evaporated and purified<sup>9</sup>. The uncertainty of +0.04 ‰ (2σ) resulting from the measurements performed on these ten samples was then considered as the external reproducibility related to the entire isotopic purification procedure. All samples from our experiments were measured at least twice. 2σ errors reported in the data are calculated from the replicates of each sample, except when their 2σ uncertainty is below the measured reproducibility, in which case the standard reproducibility was reported.

## 2.5. NICA-Donnan modeling

The NICA-Donnan model<sup>14, 21</sup> was used to simulate the “speciation” of Zn bound to the PHA. The distribution between LAS (i.e. carboxylic like) and HAS (i.e. phenolic like) was calculated using the PHA binding parameters for H, Ca and Zn taken from Milne et al.<sup>22, 23</sup> and Oste et al.<sup>24</sup>. To calculate the distribution of Zn between the two types of sites, ionic strength, pH, measured free Ca<sup>2+</sup>, total Zn and DOC concentrations in the donor side were used. Calculated [Zn<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> and [Zn]<sub>bound</sub> were compared to the experimental results.

### 3. Results

#### 3.1. Membrane experiments

For the first set of experiment (membrane alone) and in absence of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (membranes MI, MII and MIII), only 1 % of Zn remained in the supernatant and we observed an average Zn isotopic fractionation of  $+0.10 \pm 0.04 \text{ ‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n=3$  for the three membranes) between the initial solution and the supernatant (Table S1). Most Zn was recovered during the first acid wash and isotopic compositions of initial and wash solutions were similar, except for the 3<sup>rd</sup> wash solutions (Table S1). In presence of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (membranes MIV, MV, MVI), 9 to 15 % of the initial Zn remained in solutions, as Zn and Ca were in competition for membrane complexation. No isotopic fractionation was measured between initial and supernatant solutions, allowing us to conclude that, under standard DM experimental conditions, the membrane will not fractionate Zn isotopes.

#### 3.2. Donnan Membrane device validation

The absence of Zn isotopic fractionation with to the complete DM setup (membrane, donor and acceptor reservoirs) was controlled twice in absence of PHA (Table 1, 2 upper lines). More than 80 % of initial Zn ended up in the donor side, the remaining 20 % being equally shared between membrane and acceptor side. No isotopic fractionation occurred between donor and acceptor sides, even when, for the second experiment without PHA,  $\delta^{66}\text{Zn}$  of the membrane was  $-0.14 \text{ ‰}$ . No explanation could be advanced for this negative isotopic value. Nonetheless, the DM approach is a robust technique to measure the isotopic composition of free metal ions in equilibrium with various sorbents.

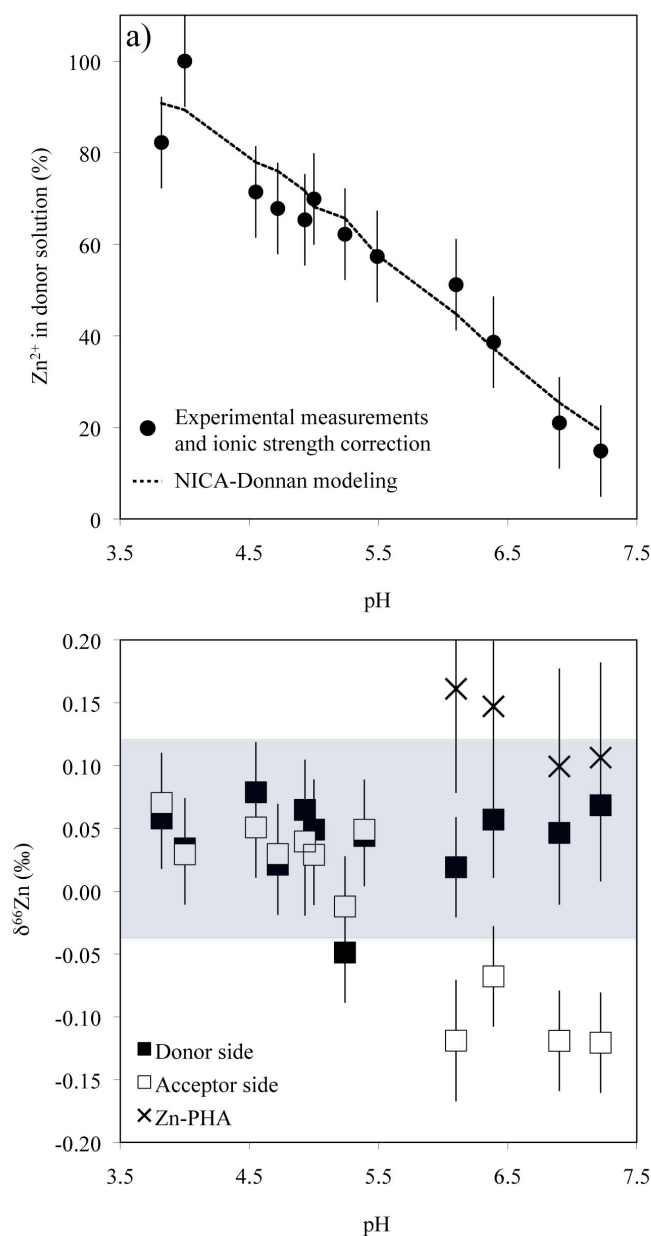
### 3.3. Zn adsorption and isotopic fractionation as a function of pH

Twelve experiments were done with PHA at pH ranging from 3.82 to 7.22. Total Zn content, Zn distribution among the different compartments (membrane, donor and acceptor sides), Zn isotopic compositions, PHA concentration and pH are given in Table 1.  $Zn^{2+}$  concentrations in the donor side were calculated from the measured concentrations in the donor and acceptor sides according to equation (2) used to correct the effects of ionic strength<sup>17</sup> :

$$\left( \frac{[Zn^{2+}]_D}{[Zn^{2+}]_A} \right)^{1/2} = \left( \frac{[Ca^{2+}]_D}{[Ca^{2+}]_A} \right)^{1/2} \quad (2)$$

where  $Zn^{2+}_A$  and  $Ca^{2+}_A$  are Zn and Ca concentrations measured in the acceptor side,  $Zn^{2+}_D$  the unknown  $Zn^{2+}$  concentration in the donor and  $Ca^{2+}_D$  was determined with the NICA-Donnan model from Ca concentration in the donor. Through the whole range of pH of our experiments, the fraction of Ca complexed with PHA ranged between 2 and 7 %. These values were considered for the recalculation of  $Zn^{2+}_D$ . Calculated  $Zn^{2+}_D$  proportions are given in Table 1 and presented in Figure 34a, along with the NICA-Donnan model predictions, as a function of pH. As expected, free  $Zn^{2+}$  in solution decreased with increasing pH. Moreover, measured and simulated  $Zn^{2+}$  concentrations were in good agreement.

Zn isotopic measurements in the donor and acceptor sides are detailed in Table 1 and presented in Figure 34b. As expected,  $\delta^{66}Zn_D$  (the isotopic ratio of the donor) was always close to the initial value (mean value for the 12 experiments of  $+0.04 \text{ ‰} \pm 0.08 \text{ } 2\sigma$ ).  $\delta^{66}Zn$  values of the acceptor were similar to those of the donor below pH 5.5 (mean value of  $+0.04 \text{ ‰} \pm 0.05$ ,  $2\sigma$ ) and differed above pH 6, with a mean  $\delta^{66}Zn$  value of  $-0.11 \text{ ‰} \pm 0.05$  ( $2\sigma$ ) in the acceptor. As for the experiments without PHA, the isotopic composition of the membrane did not disturb the isotopic measurements in acceptor and donor solutions, even for the most fractionated values ( $-0.36 \text{ ‰}$ ).



**Figure 34:** a) Proportions of free  $Zn^{2+}$  in the donor side recalculated from equation (2) from the DM experiments (black dots) and predicted with the NICA-Donnan model (dashed line) according to the pH (data from Table 1). The total Zn content was around 2.80  $\mu\text{mol}$ . b) Isotopic measurements in the donor (full squares) and acceptor (open squares) sides expressed in  $\delta^{66}Zn$  notation. The donor side contained both  $Zn^{2+}$  and Zn complexed to PHA the acceptor side contained only  $Zn^{2+}$ . The grey area corresponds to the  $2\sigma$  uncertainty above and below the mean donor value (+0.04 ‰  $\pm$  0.08  $2\sigma$ ).

## 4. Discussion

Below pH 5.5, the similarity of the isotopic compositions of the acceptor and donor sides can be interpreted as a lack of isotopic fractionation between  $\text{Zn}^{2+}$  and Zn bound to PHA or as an isotopic fractionation too small to be measured within our uncertainty. At higher pH, an isotopic fractionation between free  $\text{Zn}^{2+}$  and Zn bound to PHA occurred, with  $\text{Zn}^{2+}$  enriched in lighter isotopes and Zn bound to PHA enriched in heavier isotopes.

### 4.1. Determination of the isotopic composition of Zn complexed to PHA

The isotopic mass balance in the donor side can be written as :

$$x_{Dtot} \delta^{66}\text{Zn}_{Donor} = \frac{x_{Mb}}{2} \delta^{66}\text{Zn}_{Mb} + x_{Dmeas} F_{FreeZn} \delta^{66}\text{Zn}^{2+} + x_{Dmeas} (1 - F_{FreeZn}) \delta^{66}\text{Zn}_{PHA} \quad (3)$$

with  $\delta^{66}\text{Zn}_{Donor}$ ,  $\delta^{66}\text{Zn}_{Mb}$ ,  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$ ,  $\delta^{66}\text{Zn}_{PHA}$  being the isotopic compositions of Zn in the donor, the membrane leach, the acceptor side and the Zn bound to PHA, respectively, and  $x_{Dtot}$  corresponding to the total Zn amount (in mol) in the donor side.  $x_{Dtot}$  must account the Zn bound to the membrane  $x_{Mb}$  and the Zn measured in the donor side  $x_{Dmeas}$  :

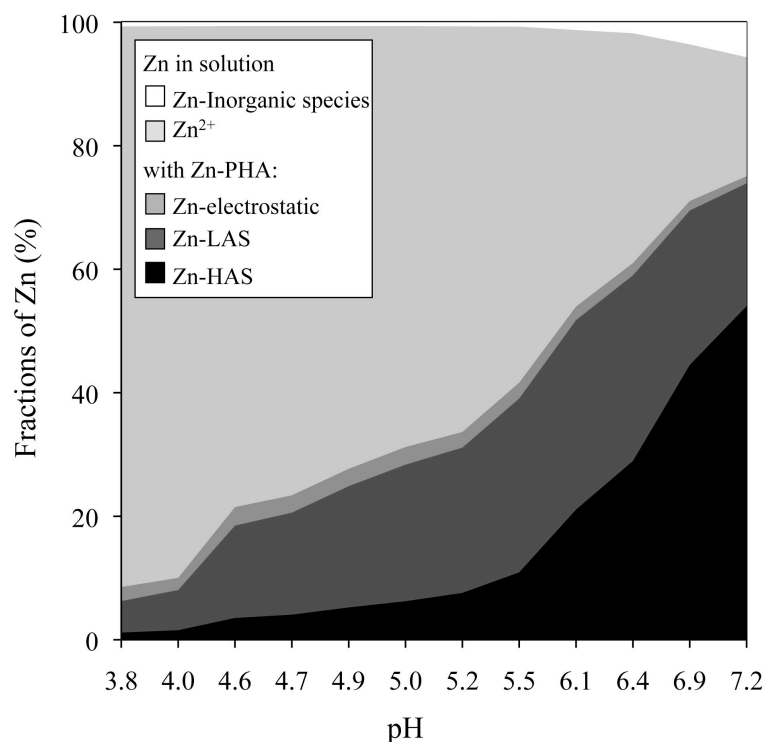
$$x_{Dtot} = \frac{x_{Mb}}{2} + x_{Dmeas} \quad (4)$$

Only half of the Zn amount determined in the membrane leach was considered as both sides of the membrane were leached during wash but only one was in contact with the donor side.  $F_{FreeZn}$  corresponds to the fraction of free Zn in the donor side. From the above isotopic mass balance, it was possible to determine the isotopic composition of Zn bound to PHA,  $\delta^{66}\text{Zn}_{PHA}$  (Table 1). The proportion of free  $\text{Zn}^{2+}$  ( $F_{FreeZn}$ ) in solution was determined by equation (2) and its isotopic composition was measured in the acceptor side. The proportion of Zn bound to PHA was deduced from the proportion of  $\text{Zn}^{2+}$ . Average  $\delta^{66}\text{Zn}_{PHA}$  for the four experiments at pH > 6 was  $+0.13 \text{ ‰} \pm 0.06$  ( $2\sigma$ ,  $n=4$ ), each individual calculated values having a propagated  $2\sigma$  error of 0.09 to 0.10 ‰ (Table 1). The isotopic fractionation between Zn-sorbed PHA and

aqueous Zn ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PHA-FreeZn}}$ ) was then calculated at  $+0.24\text{‰} \pm 0.06$  ( $2\sigma$ ), which was similar to values published for various organic or inorganic binding processes. Pokrovsky et al.<sup>8</sup> found that hematite, pyrolusite, corundum and  $\text{Al}(\text{OH})_3$  exhibited similar behavior to PHA, with heavier isotopes bound to the mineral phase. However, these authors found different behavior for birnessite and goethite (around  $-0.20\text{‰}$ ). The negative  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solid-Solution}}$  value for goethite was recently challenged by Juillot et al.<sup>9</sup> who found a  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solid-Solution}}$  of  $+0.22\text{‰}$  for goethite. These authors also found a  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solid-Solution}}$  of  $+0.56\text{‰}$  for ferrihydrite, similar to the value found by Balistrieri et al.<sup>7</sup> for the same substrate ( $+0.52\text{‰}$ ). Gélabert et al.<sup>2</sup> and John et al.<sup>3</sup> showed an enrichment of heavy isotopes in the solid phase during Zn sorption on diatoms with an isotopic offset ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Solid-Solution}}$ ) between  $0.08$  to  $0.52\text{‰}$ . Isotopic fractionation due to adsorption on bacterial surfaces also lead to an enrichment of heavy isotopes on the surface of the bacteria<sup>25</sup>. All these positive fractionation between sorbed and aqueous Zn are supported by theoretical considerations in relation to EXAFS data and CD-MUSIC calculations<sup>9</sup>. Indeed, both approaches conclude to an increase of the Zn-O bond strength when going from aqueous Zn to sorbed Zn and theoretical considerations indicate that, at equilibrium, the stronger chemical bonds should favor the heavier isotopes<sup>26</sup>. These considerations indicate that isotopic fractionation between aqueous and bound Zn must result, in our case, in an enrichment of the heavier isotopes for the Zn-HA complexes.

#### 4.2. Chemical speciation and site-specific isotopic fractionation factors

Juillot et al.<sup>9</sup> proposed to use spectroscopic data and chemical modeling of Zn bound to mineral surfaces to account for the heavy isotope enrichment on the surface. Here, we used the calculated speciation of Zn onto PHA to explain the measured fractionation. Complexation occurred through electrostatic binding, specific complexation in HAS and/or LAS.



**Figure 35:** Speciation of Zn in the donor solution as a function of pH. Zn mainly occurred as  $\text{Zn}^{2+}$  up to pH 6.1. For higher pH, Zn was mainly complexed to PHA.

Zn speciation in the donor solution and its distribution on the different binding sites of PHA calculated with the NICA-Donnan model are shown in Figure 35. Below pH 6.4, Zn sorption was dominated by LAS and electrostatic binding. Above pH 5.5 the HAS contribution to the binding became dominant. Inorganic complexes, other than  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ , were only minor components of the Zn speciation in the donor solution with contributions below 1 % for pH below 5.5 and a maximum of 6 % for pH 7.22. In these conditions, HAS could be considered as responsible for the enrichment in heavy isotopes of Zn bound to the PHA. At lower pH, association of Zn with LAS may also fractionate Zn isotopically. However, this fractionation did not appear either because the fractionation due to LAS was too small to be measured or because it was masked by the major proportion of  $\text{Zn}^{2+}$ . Electrostatic interactions only represented a small proportion of Zn bound to PHA and were not susceptible to cause a measurable isotopic fractionation. An isotopic mass balance calculation can be used to estimate the effective fractionation coefficient for both types of sites (LAS and HAS). The  $\delta^{66}\text{Zn}$  value of the free  $\text{Zn}^{2+}$  ions ( $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{model}}^{2+}$ ) in solution can be modeled by considering a closed system where isotopic equilibrium is reached between free and bound  $\text{Zn}^{7,9}$ . Using this



approach,  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}_{\text{model}}$  values depended on the isotopic ratio in the donor solution ( $\delta^{66}\text{Zn}_D$ ), the proportion of Zn bound to each type of site (Figure 3) and remaining in solution ( $F_{\text{FreeZn}}$ ) and their respective isotopic fractionation factors  $\alpha_{\text{LAS-solution}}$  and  $\alpha_{\text{HAS-solution}}$  :

$$\delta^{66}\text{Zn}^{2+}_{\text{model}} = \frac{\delta^{66}\text{Zn}_D - 1000 \times [\% \text{Zn}_{\text{LAS}} \times (\alpha_{\text{LAS-solution}} - 1) + \% \text{Zn}_{\text{HAS}} \times (\alpha_{\text{HAS-solution}} - 1)]}{F_{\text{FreeZn}} + \% \text{Zn}_{\text{LAS}} \times \alpha_{\text{LAS-solution}} + \% \text{Zn}_{\text{HAS}} \times \alpha_{\text{HAS-solution}}} \quad (5)$$

Isotopic fractionation factors  $\alpha_{\text{LAS-solution}}$  and  $\alpha_{\text{HAS-solution}}$  were fitted to obtain the best agreement between measured  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$  (acceptor side) and modeled  $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{model}}$  (Table S2 and Figure S3 in Supporting Information). The best fit was obtained for  $\alpha_{\text{LAS-solution}} = 1.0000$  and  $\alpha_{\text{HAS-solution}} = 1.0004$ . This  $\alpha_{\text{HAS-solution}}$  was not directly equivalent to the observed  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PHA-Solution}}$  of +0.24 ‰ because the observed offset integrated the effect of the entire PHA, with LAS, HAS and electrostatic interactions. The differential between  $\alpha_{\text{LAS-solution}}$  and  $\alpha_{\text{HAS-solution}}$  will lead to fluctuating isotopic offset ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PHA-Solution}}$ ) depending on the nature of the OM since the proportions of LAS and HAS may vary.

### 4.3. From bond strength and adsorption constants to isotopic fractionation

Positive isotopic fractionation factors between organically-bound and aqueous Zn can be explained by the different strength of the Zn-O chemical bond in organic functional groups and in hydrated Zn ions ( $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ ). Bond strength is related to bond length<sup>27</sup> that can be obtained by EXAFS measurements as shown by Juillot et al.<sup>9</sup> for iron oxides. Few studies report EXAFS data on zinc binding to humic substances or organic matter<sup>28-31</sup>. Sarret et al.<sup>29</sup> studied two different humic acids at different Zn concentrations. At low concentration, Zn was found to form inner-sphere complexes, with Zn-O bond length in the humic acids always smaller (from 2.03 to 2.08 Å) than in aqueous solution (2.11 Å). However, differences among binding sites were not detailed. Xia et al.<sup>28</sup> confirmed (from laboratory experiments at pH 4) that Zn forms inner-sphere complexes with humic substances. However, no bond lengths were reported in this study. In a previous study, Juillot et al.<sup>31</sup> already studied Zn sorption on the PHA used in this work by EXAFS spectroscopy. These authors confirmed that Zn was 6-fold coordinated to O atoms with a mean Zn-O distance of 2.06 Å, in agreement with the results of Sarret et al.<sup>29</sup>. The shorter Zn-O bond length systematically measured for Zn binding onto OM

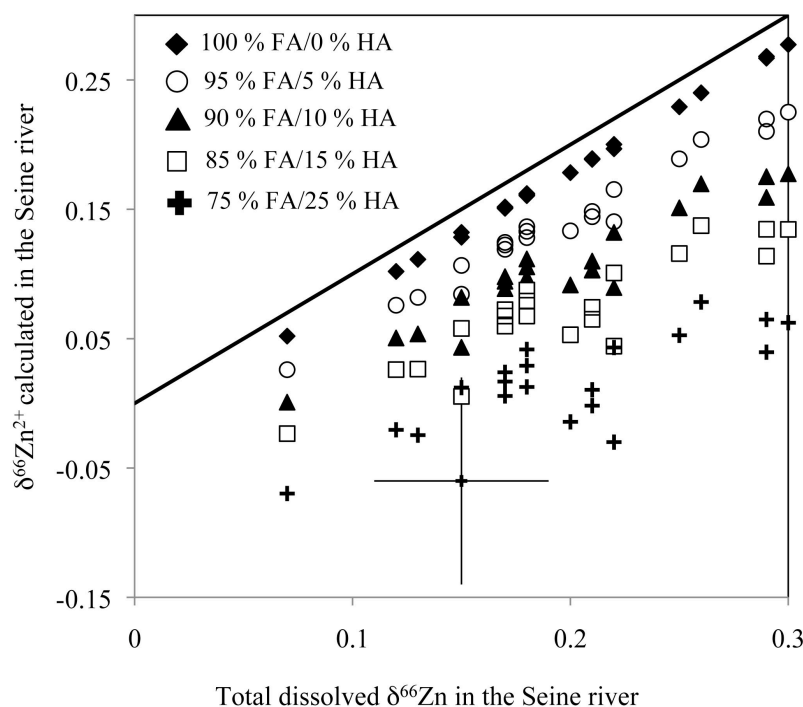
compared to aqueous Zn (hydrated  $\text{Zn}^{2+}$  complex) explains our positive  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{OM-solution}}$  values. None of the reported studies<sup>28, 29, 31</sup> could discriminate the different types of binding sites (HAS and LAS) and the associated Zn-O distances. Karlsson et al.<sup>30</sup> measured Zn-O distances for well-defined compounds like Zn-carboxylate and Zn-phenolate. According to these authors, the mean bond length value for Zn-carboxylate is 2.00 Å, whereas it is 1.91 Å for Zn-phenolate. This indicated that, for the studied model compounds, the Zn-O bonds were stronger in phenolic groups than in carboxylic ones. This latter conclusion supports the present interpretation that HAS, that are associated to phenolic groups, strongly fractionate Zn isotopes because of their shorter Zn-O bond length compared to carboxylic groups. The shorter bond length and positive isotopic fractionation can also be related to the lower binding affinity constant of LAS compared to HAS (i.e.  $\log \tilde{K}_{\text{LAS}} = 0.11 < \log \tilde{K}_{\text{HAS}} = 2.39$ ). Indeed, Gélabert et al.<sup>2</sup> already reported that higher adsorption constants are associated with larger isotopic fractionation.

#### **4.4. Influence of OM on the isotopic signature of free $\text{Zn}^{2+}$ ions of the Seine River**

In aquatic systems, OM can strongly influence the speciation of Zn and hence the isotopic composition of the different pools of Zn. Fulvic (FA) and humic (HA) acids contain variable amounts of LAS and HAS<sup>10, 32</sup> and because of the distinct isotopic fractionation factors for the two types of binding sites, differences in Zn isotopic fractionation are expected according to OM composition (i.e. LAS/HAS repartition). In these natural systems where Zn speciation is driven by the organic pool, we can simulate changes in the speciation of dissolved Zn using the generic parameters for HA and FA sites densities as well as H and Zn binding constants for the NICA-Donnan model<sup>14, 22, 23</sup> and the redefined generic Zn binding parameters for FA (see Supporting Information). From fractionation factors ( $\alpha$ ), equation (4) and calculated Zn speciation, we can deduce  $\text{Zn}^{2+}$  isotopic signature in solution for dissolved OM corresponding to various proportions of humic and fulvic acids.

Assuming that the  $\alpha$  values for LAS and HAS obtained for PHA can also be used for FA, the effect of variable amounts of FA and HA was calculated for conditions corresponding to the

Seine river, for which the bulk Zn isotopic composition in the dissolved load ( $<0.2\mu\text{m}$ ) was recently published<sup>1</sup>. Using  $\delta^{66}\text{Zn}$  measurements in the dissolved load in the Seine river water samples collected in Paris, France, between 2004 and 2007, made by Chen et al.<sup>1</sup>, and their associated concentrations of Zn and major elements, we calculated a  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$  for each of the samples. This was done considering a mean pH of 8 and a mean OM concentration of  $3.13\text{ mg.L}^{-1}$  for all the samples, various FA and HA proportions and associated Zn speciation calculated. Results are given in Figure 4. When OM in the Seine river was considered as entirely FA, the calculated  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$  values were slightly lower than those measured by Chen et al.<sup>1</sup> in the dissolved load ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissolved-Zn}^{2+}}$  of  $+0.02\text{‰}$ ). Only 5% of HA in the OM were enough to affect this linear relationship and for 25 % of HA in the OM, the  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissolved-Zn}^{2+}}$  reached  $+0.18\text{‰}$  (average value).



**Figure 36:** Modeled  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$  in the Seine river (France) as a function of the measured  $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissolved}}$  (Chen et al.<sup>1</sup>). Calculations were performed with the  $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissolved}}$  values measured by Chen et al.<sup>1</sup> for the Seine river in Paris (France), Zn and major elements concentrations in the samples, an average concentration of dissolved organic matter ( $3.13\text{ mg.L}^{-1}$ ) and an average pH of 8. Different proportions of fulvic and humic acids were tested, from 100 % FA/0 % HA to 75 % FA/25 % HA. Errors bars are represented for only one sample. These error bars correspond to the 2s reported by Chen et al.<sup>1</sup> for the x-axis and to a propagated 2s for the calculated  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$  of the y-axis.

At the first order, the isotopic composition of the source was a key parameter to be able to describe the changes in the isotopic composition of Zn in any conditions, as done in Chen et al.<sup>1</sup>. However, our calculations demonstrated that a good knowledge of the nature of OM (i.e. high versus low affinity sites) was also very important. These calculations also emphasized the importance of speciation for isotopic measurements with a possible difference between the isotopic composition of total dissolved load metals and that of free cations. Because living organisms will preferentially incorporate metals as free cations, this difference might influence the isotopic signatures of these organisms.

#### **4.5. Limitations and Applications of the DM device**

The DM device is characterized by a long equilibration time (between 48 and 72 hours) and the restricted range of elements that can be satisfactorily measured (i.e. divalent as Cu, Zn, Mg, Cd,... at low pH). It allows the measure of free cation isotopic composition from complex solutions with various soluble species, as shown in this study. However, the MD device imposes to work at equilibrium, which means that kinetic effects cannot be studied. It can be adapted for measurements of free cations in the soil solution with the soil-column DM<sup>33</sup>, which means that the determination of isotopic fractionation in OM-dominated soil systems could be envisaged. In-situ measurements in aquatic environments are also possible with a modified DM<sup>34</sup>, which consists of a double membrane cell containing the acceptor and the donor being the river/lake/ocean studied. Isotopic composition of dissolved loads (filtered at 0.2  $\mu\text{m}$ ) in a large set of natural environments could then be compared to the isotopic composition of the free metal ions, leading to evaluation of the isotopic fractionation between these two compartments. Knowing  $\delta^{66}\text{Zn}$  of free Zn ions in solution may also improve our understanding of many biogeochemical complex processes in the natural environment.

### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Laura Marang and Monique Pèpe for their experimental help, JiuBin Chen for his isotopic data in the Seine river and Bob Hilton for correcting our “french” english. We thank the critical comments from David Borrok and two anonymous reviewers that significantly improved the manuscript. This is IPGP contributions 2481.

### Literature Cited

1. Chen J.; Gaillardet J.; Louvat P., Zinc isotopes in the Seine river waters: A probe of anthropogenic contamination. *Environmental Science and Technology* **2008**, 42, 6494-6501.
2. Gélabert A.; Pokrovsky O. S.; Viers J.; Schott J.; Boudou A.; Feurtet-Mazel A., Interaction between zinc and freshwater and marine diatom species : Surface complexation and Zn isotope fractionation. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, 70, 839-857.
3. John S. G.; Geis R. W.; Saito M. A.; Boyle E. A., Zinc isotope fractionation during high-affinity and low-affinity zinc transport by the marine diatom *Thalassiosira oceanica*. *Limnology and Oceanography* **2007**, 52, 2710-2714.
4. Weiss D. J.; Mason T. F. D.; Zhao F. J.; Kirk G. J. D.; Coles B. J.; Horstwood M. S. A., Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytologist* **2005**, 165, 703-710.
5. Moynier F.; Pichat S.; Pons M-L.; Fike D.; Balter V.; Albarède F., Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chemical Geology* **2008**.
6. Viers J.; Oliva P.; Nonell A.; Gélabert A.; Sonke J. E.; Freydisier R.; Gainville R.; Dupré B., Evidence of Zn isotopic fractionation in a soil-plant system of a pristine tropical watershed (Nsimi, Cameroon). *Chemical Geology* **2007**, 239, 124-137.
7. Balistrieri L. S.; Borrok D. M.; Wanty R. B.; Ridley W. I., Fractionation of Cu and Zn isotopes during adsorption onto amorphous Fe(III) oxyhydroxide: Experimental mixing of acid rock drainage and ambient river water. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 311-328.
8. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Freydisier R., Zinc stable isotope fractionation during its adsorption on oxides and hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 291, 192-200.
9. Juillot F.; Maréchal C.; Ponthieu M.; Cacaly S.; Morin G.; Benedetti M.; Hazemann J.L.; Proux O.; Guyot F., Zn isotopic fractionation caused by sorption on goethite and 2-Lines ferrihydrite. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 4886-4900.
10. Tipping E., *Cation Binding by Humic Substances*. Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 2002.
11. Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Kinniburgh D. G.; Benedetti M. F.; Weng L., Modeling the interactions between humics, ions, and mineral surfaces. *Environmental Science and Technology* **2006**, 40 (24), 7473-7480.
12. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; De Wit J. C. M.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic acid. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1995**, 59 (6), 1101-1112.

13. Kinniburgh D. G.; Milne C. J.; Benedetti M. F.; Pinheiro J. P.; Filius J.; Koopal L. K.; Van Riemsdijk W. H., Metal ion binding by humic acid: Application of the NICA-Donnan model. *Environmental Science and Technology* **1996**, *30*, 1687-1698.
14. Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Borkovec M.; Benedetti M. F.; Avena M. J., Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and Surfaces* **1999**, *151*, 147-166.
15. Benedetti M. F.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Humic substances considered as a heterogeneous Donnan gel phase. *Environmental Science and Technology* **1996a**, *30*, 1805-1813.
16. Benedetti M. F.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Kinniburgh D. G.; Goody D. C.; Milne C. J., Metal binding by natural organic matter: from the model to the field. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1996b**, *60*, 2503-2513.
17. Temminghoff E. J. M.; Plette A. C. C.; Van Eck R.; Van Riemsdijk W. H., Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan Membrane Technique. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *417*, 149-157.
18. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Van Riemsdijk W. H., Determination of the free ion concentration of trace metals in soil solution using a soil column Donnan membrane technique. *European Journal of Soil Science* **2001**, *52*, 629-637.
19. Maréchal C. N.; Télouk P.; Albarède F., Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* **1999**, *156*, 251-273.
20. Chen J.; Louvat P.; Gaillardet J.; Birck J-L., Direct separation of Zn from dilute aqueous solutions for isotope composition determination using multi-collector ICP-MS. *Chemical Geology* **2008**, *259*, 120-130.
21. Benedetti M. F.; Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K., Metal ion binding to humic substances: application of the non-ideal competitive adsorption model. *Environmental Science and Technology* **1995**, *29*, 446-457.
22. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Tipping E., Generic NICA-Donnan parameters for proton binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* **2001**, *35*, 2049-2059.
23. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Tipping E., Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* **2003**, *37*, 958-971.
24. Oste L. A.; Temminghoff E. J. M.; Lexmond T. M.; Van Riemsdijk W. H., Measuring and modeling zinc and cadmium binding by humic acid. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 856-862.
25. Borrok D. M.; Ridley W. I.; Wanty R. B., Isotopic fractionation of Cu and Zn during adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *71*, A99.

26. Schauble E. A., Applying stable isotope fractionation theory to new systems. In *Geochemistry of non-traditional stable isotopes*, Johnson C. M.; Beard B. L.; Albarède F., Eds. Reviews in Mineralogy and Geochemistry: 2004; Vol. 55, pp 65-111.
27. Hiemstra T.; Van Riemsdijk W. H., On the relationship between charge distribution, surface hydration, and the structure of the interface of metal hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *301*, 1-18.
28. Xia K.; Bleam W.; Helmke P. A., Studies of the nature of binding sites of first row transition elements bound to aquatic and soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1997**, *61*, 2223-2235.
29. Sarret G.; Manceau A.; Hazemann J.L.; Gomez A.; Mench M., EXAFS study of the nature of zinc complexation sites in humic substances as a function of Zn concentration. *Journal de Physique IV* **1997**, *C2*, 799-802.
30. Karlsson T.; Skyllberg U., Complexation of zinc in organic soils - EXAFS evidence for sulfur associations. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 119-124.
31. Juillot F.; Morin G.; Ildefonse P.; Trainor T. P.; Benedetti M.; Galois L.; Brown Jr G. E., Occurrence of Zn/Al hydrotalcite in smelter-impacted soils from northern France: Evidence for EXAFS spectroscopy and chemical extractions. *American Mineralogist* **2003**, *88*, 509-526.
32. Milne C. J. Measurement and modelling of ion binding by humic substances. PhD thesis, The University of Reading, 2000.
33. Cancès B.; Ponthieu M.; Castrec-Rouelle M.; Aubry E.; Benedetti M. F., Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* **2003**, *113*, 341-355.
34. Kalis E. J. J.; Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Van Riemsdijk W. H., Measuring free metal ion concentrations in situ in natural waters using the donnan membrane technique. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*, 955-961.



pH	PHA mg/L	Zn Total μmol	Zn fraction (%)			$F_{FreeZn}$ %	$\delta^{66}Zn$ measured									Mass		$\delta^{66}Zn_{model}$		$\Delta^{66}Zn$	
			Donor	Acceptor	Membrane		Donor	2σ	n	Acceptor	2σ	n	Membrane	2σ	n	Balance (‰)	2σ	PHA	2σ	ZnPHA-Zn <sup>2+</sup>	2σ
4.00	0	2.77	84.0	8.5	6.4	100	0.00	0.04	3	0.01	0.04	3	-0.03	0.04	2	-0.01	0.04	nd	nd	nd	nd
4.50	0	2.75	82.6	8.7	8.5	100	0.03	0.08	3	0.03	0.04	5	-0.14	0.04	3	0.02	0.07	nd	nd	nd	nd
3.82	92	3.25	82.5	9.6	7.9	82.2	0.06	0.04	2	0.07	0.04	2	0.02	0.04	2	0.06	0.04	nd	nd	nd	nd
4.00	92	2.55	82.1	11.0	6.9	100.0	0.03	0.04	4	0.03	0.04	2	0.02	0.04	2	0.03	0.04	nd	nd	nd	nd
4.55	98	3.03	84.4	7.9	7.7	71.4	0.08	0.04	2	0.05	0.04	2	-0.01	0.04	2	0.07	0.04	nd	nd	nd	nd
4.72	92	3.14	85.8	6.9	7.3	67.8	0.02	0.04	2	0.03	0.04	2	-0.06	0.16	4	0.02	0.04	nd	nd	nd	nd
4.93	86	2.92	83.8	8.0	8.1	65.3	0.06	0.04	2	0.04	0.06	2	0.05	0.04	2	0.06	0.04	nd	nd	nd	nd
5.00	93	2.59	82.4	6.9	10.7	69.9	0.05	0.04	3	0.03	0.04	2	-0.36	0.07	3	0.00	0.04	nd	nd	nd	nd
5.24	86	2.62	88.7	5.2	6.1	62.2	-0.05	0.04	4	-0.01	0.04	2	-0.05	0.05	2	-0.05	0.04	nd	nd	nd	nd
5.39	98	2.95	83.4	5.1	11.5	57.3	0.04	0.04	2	0.05	0.04	2	0.05	0.04	2	0.04	0.04	nd	nd	nd	nd
6.10	91	2.44	89.2	4.6	6.2	51.2	0.02	0.04	2	-0.12	0.05	2	-0.36	0.10	3	-0.01	0.04	0.16	0.08	0.28	0.10
6.39	100	2.67	88.5	3.7	7.7	38.6	0.06	0.05	2	-0.07	0.04	2	-0.11	0.04	2	0.04	0.04	0.15	0.08	0.21	0.09
6.90	101	2.68	92.6	2.1	5.3	21.0	0.05	0.06	3	-0.12	0.04	3	-0.04	0.11	4	0.04	0.05	0.10	0.08	0.22	0.09
7.22	99	2.72	93.0	1.5	5.6	14.8	0.07	0.06	2	-0.12	0.04	3	0.03	0.07	4	0.06	0.06	0.11	0.08	0.23	0.09

**Table 1:** Zn concentration and isotopic compositions resulting from Donnan Membrane (DM) device experiments in the 3 compartments (donor side, acceptor side and membrane leach). Initially, only the donor side contained Zn, whereas the electrolyte  $Ca(NO_3)_2$  was 2 mmol.L<sup>-1</sup> in both sides.  $Zn^{2+}_D$  corresponded to free  $Zn^{2+}$  concentration of the donor side as calculated with equation (2).  $\delta^{66}Zn_{PHA}$  and  $\Delta^{66}Zn_{PHA-solution}$  calculation was not performed for experiments below pH 6.10 because isotopic compositions in donor and acceptor sides were too close and results would be meaningless. The errors were propagated for the calculated values. The isotopic mass balance was determined with the 3 fractions of Zn (acceptor and donor sides and membrane). The two first experiments were performed without organic matter, whereas the twelve other experiments were done with PHA (Purified Humic Acid).  
nd = not determined

# Zinc isotopic fractionation: why organic matters

D. Jouvin<sup>1,2\*</sup>, P. Louvat<sup>2</sup>, F. Juillot<sup>3</sup>, C. N. Maréchal<sup>4</sup> and M.F. Benedetti<sup>1</sup>

(1) Équipe de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot – Institut de Physique du Globe de Paris, Batiment Lamarck, 75205 Paris cedex 13, France

(2) Équipe de Géochimie et Cosmochimie, Université Paris Diderot – Institut de Physique du Globe de Paris, 2 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

(3) Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux condensés, Université Pierre et Marie Curie - Université Paris Diderot – Institut de Physique du Globe de Paris, 140 rue de Lourmel, 75015 Paris, France

(4) Unité de Formation et de Recherche de Sciences de la Terre, Université Lyon 1, 2 rue Dubois, 69622 Villeurbanne cedex, France

## Supporting information

Number of pages: 9

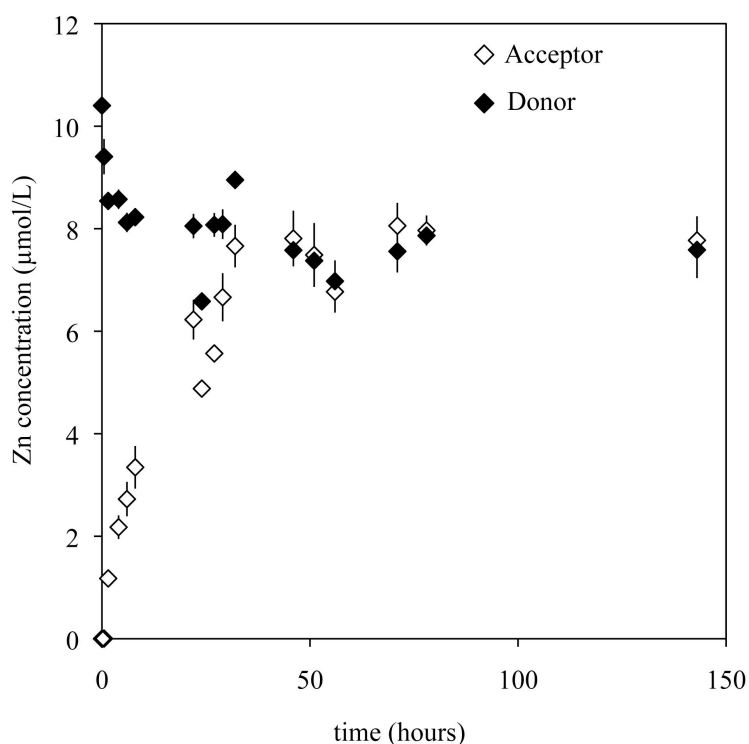
Number of tables: 2

Number of figures: 4

\*Corresponding author: [jouvin@ipgp.jussieu.fr](mailto:jouvin@ipgp.jussieu.fr)

### 1. Equilibrium time of the Donnan Membrane device

The Donnan Membrane (DM) device is known in the literature to equilibrate within 48h for divalent cations. Three experiments were made to check the equilibration time of this device. The acceptor and donor sides contained 2 mmol.L<sup>-1</sup> of Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, with Zn only in the donor side. 1 mL in the acceptor and donor solution were sampled and replaced by 1 mL of Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and Zn concentration was determined in each of these samples. Results are presented in figure S1.



**Figure S1:** Zn concentrations in the acceptor and donor sides as a function of time (average of 3 experiments) in absence of PHA. Zn concentrations in acceptor and donor sides of the device were similar after 48h. However the time chosen for experiments was 72h to ensure full equilibrium.

## 2. MC-ICP-MS instrumental mass bias correction

Zn isotopes measurements by MC-ICP-MS Neptune were corrected by Cu-doping technique and then normalized by their bracketing standards (also Cu-doping corrected).

Classically, the exponential law is used to describe mass discrimination<sup>1</sup> :

$$R_m = R_t \times \left( \frac{M_x}{M_y} \right)^\beta \quad (1)$$

where  $R_m$  is the measured isotopic ratio,  $R_t$  the true ratio,  $M_x$  and  $M_y$  the two masses of the selected isotopes, and  $\beta$  the mass discrimination coefficient. This equation can be written for Zn (with two of the five isotopes  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ,  $^{68}\text{Zn}$  and  $^{70}\text{Zn}$ ) and for Cu (with  $^{63}\text{Cu}$  and  $^{65}\text{Cu}$ ). Previous studies<sup>1, 2</sup> have shown that  $\beta_{\text{Cu}}$  and  $\beta_{\text{Zn}}$  were different and that  $\beta_{\text{Zn}}$  was systematically higher than  $\beta_{\text{Cu}}$  for plasma 54 MC-ICP-MS measurements.

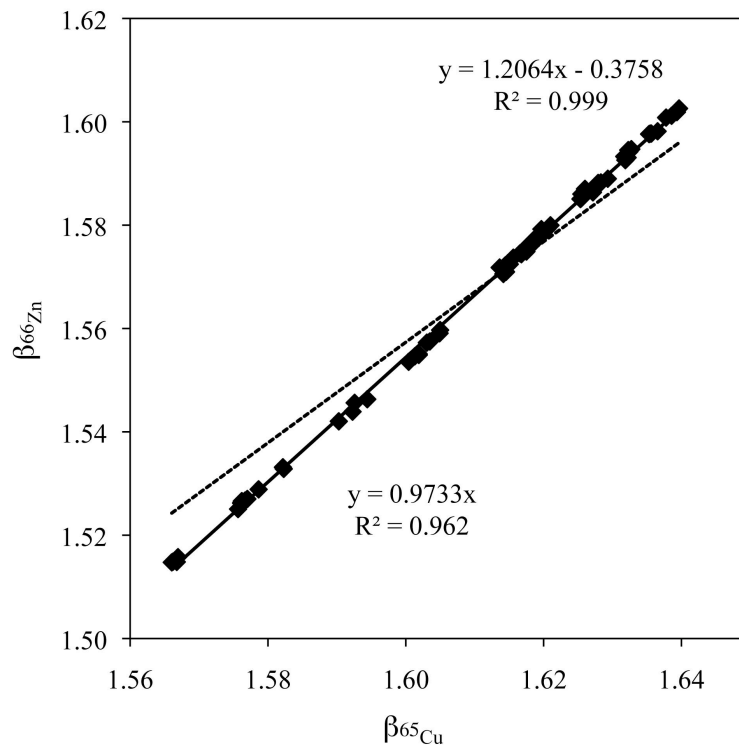
In the case of Zn and Cu isotopic standard solutions,  $R_t$  was known and allowed the precise calculation of  $\beta$  for both Cu and Zn. Plotting  $\beta_{\text{Cu}}$  versus  $\beta_{\text{Zn}}$  for all standards during one measurement session (around 10 hours) led to a straight line (Figure S2) with equation :

$$\beta_{\text{Zn}} = a \times \beta_{\text{Cu}} + b \quad (2)$$

where, in our case,  $\beta_{\text{Zn}}$  was systematically lower than  $\beta_{\text{Cu}}$  for our Neptune MC-ICP mass spectrometer.

Since  $b$  was not negligible (as can be seen on Figure S2), the ratio  $\beta_{\text{Zn}}/\beta_{\text{Cu}}$  could not be considered to be constant through time. Thus for each sample, Zn mass discrimination coefficient  $\beta_{\text{Zn}}$  was recalculated from the measured  $\beta_{\text{Cu}}$  of the sample following equation (3) :

$$\beta_{\text{Zn}}^{\text{corr}} \text{ sample} = a \times \beta_{\text{Cu}} \text{ sample} + b \quad (3)$$



**Figure S2:** Relation between mass discrimination coefficients  $\beta_{Zn}$  and  $\beta_{Cu}$  for Zn-Cu standard solution during one measurement session (April 25<sup>th</sup>, 2008).  $\beta_{Zn}$  and  $\beta_{Cu}$  were calculated from measured and known  $^{66}Zn/^{64}Zn$  and  $^{65}Cu/^{63}Cu$  isotopic ratios, using an exponential mass fractionation law. The dotted line represents the linear regression of the data forced through the origin and the black line the linear regression without any forcing.

a and b are the linear regression coefficients defined for the set of Cu-Zn standard solution measurements during the session (equation 2). The knowledge of  $\beta_{Zn}^{corr}$  sample allowed us to recalculate the true ratio in any sample, following the exponential law (here for the ratio  $^{66}Zn/^{64}Zn$ ):

$$\left( \frac{^{66}Zn}{^{64}Zn} \right)_t = \left( \frac{^{66}Zn}{^{64}Zn} \right)_m \left( \frac{M_{66}}{M_{64}} \right)^{-\beta_{Zn}^{corr}} \quad (4)$$

Finally, the isotopic composition of the sample was expressed relatively to the previous and next measurements of standards (also corrected via the  $\beta_{\text{Cu}}\text{-}\beta_{\text{Zn}}$  method) in the acquisition queue :

$$\delta^{66}\text{Zn} = \left( \frac{\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{sample}}}{\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (5)$$

with  $\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{sample}}$  calculated with equation (4) and  $\left( \frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{standard}}$  the weighted bracketing standard  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ .

### 3. Membrane alone experiments

The isotopic fractionation due to Zn adsorption on the membrane in absence of PHA was tested. Three membranes were immersed in 50 mL of aqueous solution of Zn (membranes I, II and III). Three other membranes were immersed in 50mL of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mmol.L<sup>-1</sup> solution (membranes IV, V and VI). After 3 days, aqueous and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  solutions were collected and membranes were washed three times in  $\text{HNO}_3$  1 mol.L<sup>-1</sup> (20 mL) or  $\text{HCl}$  2 mol.L<sup>-1</sup> (40 mL). The total Zn content added is around 32.6  $\mu\text{mol}$ .

		Solution after 3 days			First wash Membrane			Second wash Membrane			Third wash Membrane			Mass Balance	
		$\mu\text{mol}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	2s	$\mu\text{mol}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	2s	$\mu\text{mol}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	2s	$\mu\text{mol}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	2s	‰	2s
without	Mb I *	0.3	0.08	0.06	31.1	0.02	0.05	1.6	-0.06	0.04	0.1	-0.04	0.04	0.02	0.04
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Mb II *	0.4	0.13	0.04	28.2	0.08	0.04	2.8	0.01	0.04	0.3	-0.03	0.04	0.07	0.04
	Mb III *	0.3	0.09	0.04	27.4	0.00	0.04	3.0	-0.01	0.04	0.3	-0.03	0.04	0.00	0.04
with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Mb IV *	4.1	-0.01	0.05	24.2	-0.02	0.04	2.3	-0.03	0.04	0.3	-0.04	0.04	-0.02	0.04
	Mb V **	5.0	0.03	0.04	27.6	0.01	0.04	0.2	0.06	0.04	<lod	<lod	<lod	0.02	0.04
	Mb VI**	3.2	0.03	0.04	32.5	0.02	0.04	0.4	0.05	0.04	<lod	<lod	<lod	0.02	0.04

\* Three washes in 20mL  $\text{HNO}_3$  1N

\*\* Two washes in 40mL  $\text{HCl}$  2N

<lod : inferior to detection limit

**Table S1:** Zn concentrations and isotopic compositions for the experiments performed with the membrane alone. Mass balance was calculated ( $2\sigma$  for isotopic mass balance correspond to propagated errors). In absence of competition (i.e. without  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), 99 % of Zn was complexed to the membrane and an isotopic fractionation in the supernatant was observed. In presence of Ca as a competitor, less Zn was complexed to the membrane and no fractionation was observed in the supernatant. For membrane  $\text{HCl}$  leaches, the Zn concentration in the third leach was too low to allow any measurement.

#### 4. Specific isotopic fractionation factors for the low and high affinity sites of the Purified Humic Acid

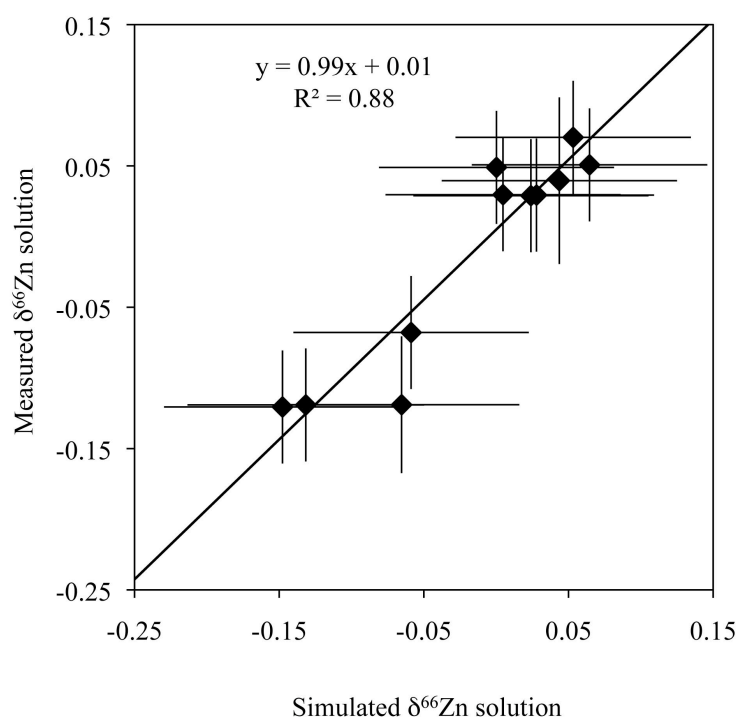
Following the mass balance (Equation (4) in the main manuscript) in the donor solution, calculations were made with different values of  $\alpha_{\text{HAS}}$  and  $\alpha_{\text{LAS}}$  in order to fit  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}_{\text{model}}$  and  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$  measured in the acceptor. When plotting  $\delta^{66}\text{Zn}$  of free  $\text{Zn}^{2+}$  in solution as a function of  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}_{\text{model}}$  (Figure S3), a regression line was defined and the slope, intersection with y-axis and the regression factor ( $R^2$ ) for various  $\alpha_{\text{HAS}}$  and  $\alpha_{\text{LAS}}$  are given in table S2. The best fit (slope of 1 and intersection with y-axis of 0) was 1.000395 for  $\alpha_{\text{HAS}}$  and 1 for  $\alpha_{\text{LAS}}$ . Other possibilities like  $\alpha_{\text{HAS}}$  with a value of 1.00037 and  $\alpha_{\text{LAS}}$  of 1.0001 were also possible.

$\alpha_{\text{HAS}}$	$\alpha_{\text{LAS}}$	slope	intersection	$R^2$
1.000360	1.000000	1.10	0.00	0.88
1.000370	1.000000	1.07	0.00	0.88
1.000380	1.000000	1.04	0.00	0.88
1.000390	1.000000	1.02	0.00	0.88
1.000400	1.000000	0.99	0.01	0.88
1.000370	1.000000	1.07	0.00	0.88
1.000370	1.000100	1.00	0.02	0.89
1.000370	1.000200	0.92	0.04	0.88
1.000380	1.000000	1.04	0.00	0.88
1.000380	1.000050	1.01	0.01	0.89
1.000380	1.000100	0.98	0.02	0.89
1.000390	1.000000	1.02	0.00	0.88
1.000390	1.000050	0.99	0.01	0.89
1.000390	1.000100	0.95	0.02	0.89

**Table S2:** Slope and intersection values for the linear regression between measured and simulated  $\delta^{66}\text{Zn}$  (see Figure S3) for various  $\alpha_{\text{HAS}}$  and  $\alpha_{\text{LAS}}$ .

With lower values for  $\alpha_{\text{HAS}}$  (below 1.0036) and higher values for  $\alpha_{\text{LAS}}$  (above 1.00015), the fit was always above the 1:1 line and the slope slightly higher than 1. The  $\alpha_{\text{LAS}}$  had then to be below 1.0001. We chose the 1.0004/1.0000 possibility for  $\alpha_{\text{HAS}}$  and  $\alpha_{\text{LAS}}$  because our experiments did not allow to resolve any fractionation on the LAS sites and such small variation (1.000395 versus 1.00040) on the HAS sites.



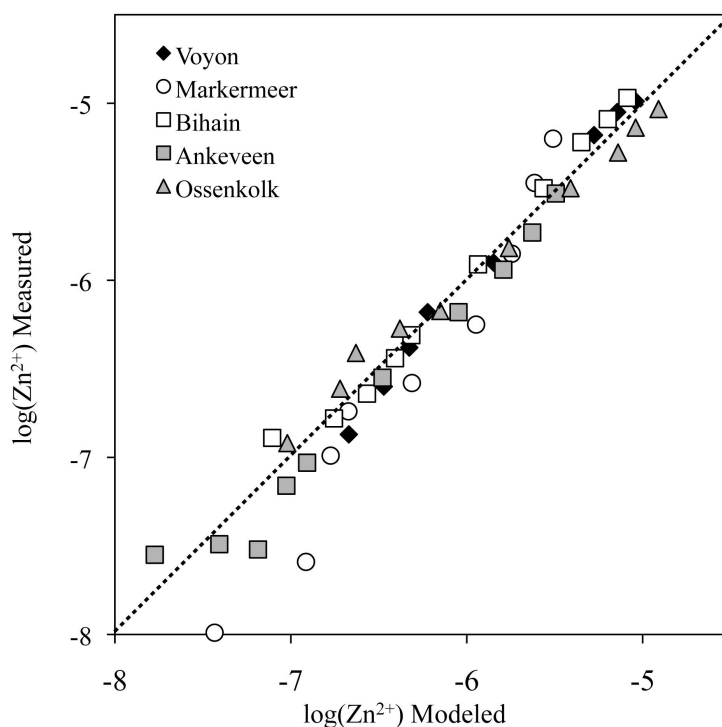


**Figure S3:** Comparison between  $\delta^{66}\text{Zn}$  of free  $\text{Zn}^{2+}$  in solution, measured in the acceptor side and  $\delta^{66}\text{Zn}^{2+}$  modeled through isotopic mass balance calculation (Equation (4)) for  $\alpha_{\text{HAS}}$  of 1.0004 and  $\alpha_{\text{LAS}}$  of 1.0000.

## 5. Updating generic Zn binding parameters for fulvic acid (FA)

To simulate the influence of organic matter with various proportions of humic and fulvic acids (HA and FA) on the  $\delta^{66}\text{Zn}$  of  $\text{Zn}^{2+}$ , the NICA-Donnan generic parameters for Zn sorption onto FA were updated. New data were published since the compilation of Milne et al.<sup>3</sup> and the FA parameters based on a limited number of data points needed reevaluation. The new FA generic parameters were obtained by adjusting the extensive data set of Zn binding to natural OM published by Cheng et al.<sup>4</sup>. The fitting procedure is similar to the one described by Milne et al.<sup>3</sup> and only  $\tilde{K}_{1\text{Zn}}$ ,  $\tilde{K}_{2\text{Zn}}$  as well as  $n_{1\text{Zn}}$  and  $n_{2\text{Zn}}$ , the average Zn binding constants of low and high affinity sites and the corresponding non-ideality parameters, were adjusted. The results of this adjustment are shown in figure S4. The new Zn parameters were similar to

the ones obtained for the generic humic acid in Milne et al.<sup>3</sup> : 0.11, 2.39, 0.67 and 0.27 for  $\log(\tilde{K}_{1Zn})$ ,  $\log(\tilde{K}_{2Zn})$ ,  $n_{1Zn}$  and  $n_{2Zn}$  respectively.



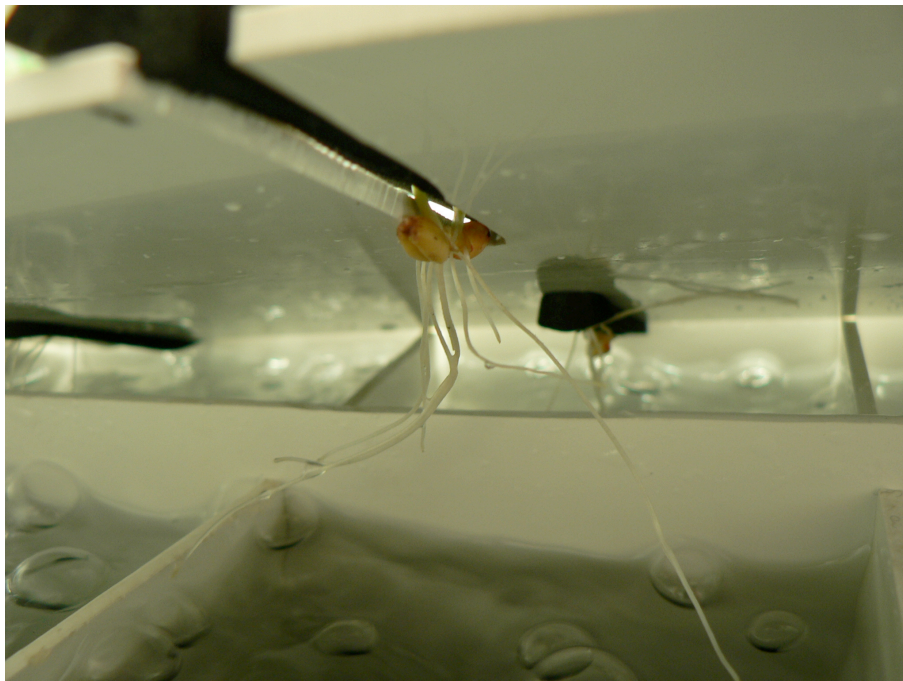
**Figure S4:** Comparison between free  $Zn^{2+}$  measured in surface freshwaters in different European locations (Voyon, Markermeer, Bihain, Ossenkolk, Ankeveen) by Cheng et al.<sup>4</sup> and modeled with the NICA-Donnan model with adjusted Fulvic Acid (FA) parameters.

### Literature Cited

1. Maréchal C. N.; Télouk P.; Albarède F., Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* **1999**, *156*, 251-273.
2. Albarède F.; Telouk P.; Blichert-Toft J.; Boyet M.; Agranier A.; Nelson B., Precise and accurate isotopic measurements using multi-collector ICPMS. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2004**, *68*, 2725-2744.
3. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Tipping E., Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* **2003**, *37*, 958-971.
4. Cheng T.; De Schamphelaere K.; Lofts S.; Janssen C.; Allen H. E., Measurement and computation of zinc binding to natural dissolved organic matter in European surface waters. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *542* (2), 230-239.

## **Chapitre IV**

### **Copper and zinc isotopic fractionation by tomato and wheat plants**





# Fractionnement isotopique du Cu et du Zn lors du prélèvement par des plants de blé et de tomate

## Résumé

Le fractionnement isotopique du cuivre associé au prélèvement par les plantes n'a encore jamais été mesuré et, dans le cas du zinc, cela reste encore mal compris. Comme l'a montré Guelke et al.<sup>1</sup>, le fractionnement isotopique du fer dans les plantes dépend des stratégies mises en place par celles-ci pour le prélever. Les racines des plantes de stratégie I (dicotylédones et monocotylédones autres que les graminées) produisent des protons pour solubiliser le fer(III) et le réduisent avant son absorption alors que celles des plantes de stratégie II (seulement les graminées) exudent des complexants organiques spécifiques, appelés phytosidérophores<sup>2</sup>. Pour les premières, il a été observé un léger enrichissement en isotopes lourds du fer dans les plantes par rapport au sol alors que les secondes présentent un enrichissement prononcé en isotopes légers du fer par rapport au sol<sup>1</sup>. Les transporteurs du fer sont toutefois susceptibles de prélever aussi le cuivre et le zinc, aussi bien pour les plantes de stratégie I que de stratégie II<sup>3-5</sup>.

Les signatures isotopiques associées au prélèvement par des plantes de stratégie I, la tomate, et de stratégie II, le blé, ont été déterminées expérimentalement pour de jeunes pousses ayant poussé en hydroponie, avec deux concentrations en fer différentes dans la solution nutritive (+Fe ou -Fe) dans le cadre de cette thèse, à comparer avec l'étude de Weiss et al. 2005 [Weiss D. J., Mason T. F. D., Zhao E. J., Kirck G. J. D., Coles B. J., Horstwood M. S. A., (2005) Isotopic fractionation of zinc in higher plants, *New Phytologist*, **165**, 703-710].

La concentration en zinc dans les plantes augmente lorsque la concentration en fer de la solution est faible (-Fe), ce qui implique des modes de prélèvement similaires pour le zinc et le fer. La déficience en fer n'a, avec notre dispositif, aucun effet sur le prélèvement du cuivre, en concentrations. Le fractionnement isotopique du cuivre pour les deux plantes est caractérisé par un enrichissement en isotope léger dans les racines par rapport à la solution

nutritive ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Racines-SolutionNutritive}}$  de -0.84 à -0.11 ‰) puis des parties aériennes aux racines ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{PartiesAériennes-Racines}}$  de -0.41 à -0.16 ‰). Le zinc présente un comportement différent sur les racines avec un léger enrichissement en isotopes lourds, voire pas de fractionnement sur les racines comparé à la solution nutritive ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Racines-SolutionNutritive}}$  de -0.02 à 0.16 ‰). Dans les parties aériennes, les comportements du cuivre et du zinc sont similaires ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PartiesAériennes-Racines}}$  de -0.51 à -0.25 ‰). Cette différence au niveau des racines peut s'expliquer par : i) une différence de stratégie pour le prélèvement du cuivre et du zinc avec en particulier la réduction du cuivre avant son absorption par les racines ou ii) une différence de spéciation et d'espèces chimiques prélevées dans la solution. A l'inverse, la similarité du fractionnement isotopique mesuré lors de la translocation (des racines vers les parties aériennes) suggère l'implication de transporteurs internes comparables pour le cuivre et le zinc<sup>6,7</sup>, par exemple la nicotianamine.

## Cu and Zn isotopic fractionation by plants

D. Jouvin<sup>1,3</sup>, D. Weiss<sup>2</sup>, P. Louvat<sup>3</sup>, F. Ferec<sup>1</sup>, M. N. Bravin<sup>4</sup>, P. Hinsinger<sup>4</sup> and M. F. Benedetti<sup>1</sup>

(1) Équipe de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot - Institut de Physique du Globe de Paris - UMR CNRS 7154, 75252 Paris, France

(2) Earth Science and Engineering, Imperial College and The Natural History Museum London, London SW7 5PD, UK

(3) Équipe de Géochimie et Cosmochimie, Université Paris Diderot - Institut de Physique du Globe de Paris - UMR CNRS 7154, 75252 Paris, France

(4) Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1222 Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère, INRA - SupAgro, Montpellier, France



## Abstract

The isotopic fractionation of Cu associated with plant activity in soils has not yet been documented and for Zn, it is still a matter for debate. Previous studies showed that fractionation of Fe isotopes depended on the uptake strategy of the plant. The level of Fe supply might therefore influence the Cu and Zn uptake as well as the isotopic signatures. Cu and Zn uptake and isotopic signatures for plants presenting different Fe uptake strategy (tomato, wheat, rice and lettuce) was measured experimentally. The effect of the Fe concentration in the nutrient solutions and the speciation of Cu and Zn in the solution, modified by chelators, on Cu and Zn isotopes fractionation in plants was also tested.

At low Fe supply, the amount of Zn uptake increased for both plants compared to higher Fe supply, indicating, at least partially, similar pathways for Zn and Fe uptake. Zn shows no isotopic fractionation or a small enrichment in heavy isotopes in the roots compared to the nutrient solution ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Roots-NutrientSolution}}$  from -0.02 to 0.16 ‰) and likewise an enrichment of lighter isotopes during translocation ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Shoots-Roots}}$  from -0.51 to -0.25 ‰). For Cu, no influence of Fe status in the plants was observed. Cu isotopic signatures are characterized by an enrichment of lighter isotopes in the roots compared to the nutrient solution ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Roots-NutrientSolution}}$  from -0.84 to -0.11 ‰) and in the shoots compared to the roots ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoots-Roots}}$  from -0.41 to +0.16 ‰). The isotopic composition of the roots reflects multiple processes such as metal complexation in the nutrient solution, adsorption onto the root apoplasm, membranes transport via specific or non-specific transporters. These isotopic fractionation differences between Cu and Zn might then be explained by different uptake strategies, especially via reduction-oxidation in the case of Cu or differences in metal speciation in the solution and thus different species taken up by the plants (free metal ion for Zn and inorganic complexes for Cu). The similarity for Cu and Zn isotopic fractionation during translocation suggested conversely the implication of comparable internal transporters used by plants to mobilize metals.

## 1. Introduction

Cu and Zn are important micronutrients, being essentials for life<sup>1, 2</sup>, while also being toxic in high concentrations<sup>3, 4</sup>. A firm understanding of how Cu and Zn are incorporated and redistributed within the biosphere is therefore key to alleviating problems associated with metal deficiency and toxicity in natural and agricultural ecosystems. Measuring isotopic ratios provides a unique opportunity for quantifying metal source and migration pathways within the different parts of a plant and along food chains. However, in order to fully understand isotopic ratios in the environment, it is necessary to know the isotopic signature of the different sources and how the different chemical and biological processes will eventually modify them.

Concerning Cu and Zn interactions with the biota, it is still poorly documented but significant isotopic fractionation have been emphasised. In-vivo uptake of Cu by proteins within unicellular organisms (*Pseudomonas aeruginosa* and Yeast) have been observed to selectively incorporate isotopically light Cu by up to -1.53 ‰ (in  $\delta^{65}\text{Cu}$ ) relatively to the source material<sup>5</sup>. More recently, Pokrovsky et al.<sup>6</sup> measured an enrichment of Cu lighter isotopes in microorganisms in media below pH 4 (up to -1.8‰ in  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Solid-Solution}}$ ), while no fractionation was observed above pH 4. Conversely, Mathur et al.<sup>7</sup> and Kimball et al.<sup>8</sup> tested Cu-minerals leaching in presence of bacteria and deduced that  $^{65}\text{Cu}$  was preferentially taken up by bacteria. During incorporation of Zn by diatoms, an enrichment of Zn heavy isotopes compared to the growth media was observed by Gélabert et al.<sup>9</sup>. John et al.<sup>10</sup> found similar results for non-washed cells whereas, when only absorption is considered, lighter isotopes are favoured in the cells. They also measured lower isotopic fractionation for high-affinity uptake (-0.1 ‰ amu<sup>-1</sup>) compared to the low-affinity uptake (-0.4 ‰ amu<sup>-1</sup>).

For higher plants, experimental work was conducted only on Zn. Weiss et al.<sup>11</sup> cultivated tomato, lettuce and rice plants under controlled conditions and showed an enrichment of heavy isotopes in the roots compared to the initial solution and a systematic depletion in heavy isotopes during translocation (transport from roots to shoots). This fractionation was species-dependant but also dependant on the speciation of Zn in the nutrient solution. More recently, Moynier et al.<sup>12</sup> studied the early stage of growth of lentils and bamboos. In lentils after 5 days of growth, leaves were systematically lighter than germinated seeds regardless of the nutrient solution added. For bamboos after 14 days of growth, no isotopic fractionation was observed between rhizome and stem, while lighter isotopes were preferentially

translocated in the leaves. In a tropical environment, Viers et al.<sup>13</sup> reported more complex behaviour, with no clear trend during translocation. In agreement with Weiss et al.<sup>11</sup>, leaves in trees also showed a lighter composition than trunks and branches.

The uptake of Zn by plants clearly fractionates Zn isotopes and this is due to a variety of biotic and abiotic processes, including metal mobilisation from the soil substrate, root adsorption, root-membrane absorption, *in vivo* translocation and cellular use. Guelke et al.<sup>14</sup> demonstrated the effect of Fe plant uptake strategy (called strategy I or II) onto the Fe isotopic fractionation in plants. Strategy I plants, i.e. graminaceous monocotyledons (which include the majority of cereal crops), release phytosiderophores from their roots<sup>15</sup>, which complex trace metals in the soil substrate. These metal complexes are uptaken *in toto* across the root membrane by specific membrane receptors, which complements the direct uptake of free metal ions from the solution. In contrast, strategy II plants, i.e. non-graminaceous monocotyledons and dicotyledons, uptake metals exclusively as free ions and do not release significant quantities of phytosiderophores from their roots<sup>15</sup>. Fe uptake is further influenced by the activities of reductase enzymes in the root membrane at the interface with the soil solution. These enzymes reduce chelated Fe(III) to free Fe(II) ions that are then available for root absorption. It has been proposed that reductase-type enzymes can also reduce chelated Cu<sup>2+</sup>, releasing free Cu<sup>+</sup> ions for root uptake<sup>16</sup>. Reductase expression in graminaceous monocotyledons is relatively weak compared to non-graminaceous monocotyledons and dicotyledons<sup>17</sup>. These two strategies were shown to be not fully Fe specific<sup>18, 19</sup>. Thus, a comparison between these two types of plants offers the opportunity to investigate isotopic fractionation of Cu and Zn during their uptake by higher plants.

We thus decided to address the effect of plant's metal strategy in two hydroponic experiments, circumventing the complexities introduced by soil matrices. These experiments allow us to determine for the first time the Cu isotopic fractionation due to plant uptake. In the first experiment, lettuce, tomato and rice were grown in two different nutrient solutions (HEDTA+NTA versus EDTA), in order to investigate the effect of speciation on the isotopic fractionation. In the second experiment, tomato and wheat were exposed to either sufficient or deficient Fe concentrations in the nutrient solution, in order to maximize the effect of the plant Fe strategy on the Cu and Zn uptake.

## 2. Materials and methods

All the materials and methods for the first experiments are described in Weiss et al.<sup>11</sup>. For the second experiments, they are developed in the following sections.

### 2.1. Plant growth

Plants were cultivated in a growth chamber with the following conditions: a day duration of 16 h, at 25°C with a relative humidity of 75 % and a photon flux of about 450-480  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (in the range 400-700 nm) and a night of 8h at 20 °C, with a relative humidity of 100 % and darkness.

Seeds of durum wheat (*Triticum turgidum durum* L., cv Acalou) and tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv Saint Pierre) were surface sterilized with 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and then germinated in Petri dishes containing a cellulose paper humected with a germination solution containing 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  and 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  until the grown roots were long enough for the plants to be put in containers (around two days). The plants were transferred in four 35 L containers (two containers with tomato seeds and two containers with wheat seeds), with twenty groups of plant per container and, respectively, 2 and 10 seedlings per group for wheat and tomato. Until the end of the first week of growth, the nutrient solution had the same composition (600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  and 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) and was then changed for a more “complete” solution: 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , 2  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ , 2  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{Ca(NO}_3)_2$ , 500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2$ , 50  $\text{nmol.L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{NaFe(III)EDTA}$ , 1.3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{CuCl}_2$ , 1.6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ . This complete solution (called “+Fe solution”) was applied to all the containers during the second week of growth. During the third week of growth, half of the containers (one container with tomato and one with wheat) stayed with this + Fe solution, while the other half were filled with nutrient solution with lower Fe, Cu and Zn concentrations (called “-Fe solution”): 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{NaFe(III)EDTA}$ , 0.4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{CuCl}_2$ , 0.62  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ . The Fe concentrations of +Fe and -Fe solutions stand for Fe-sufficient and Fe-deficient concentrations for both tomato and wheat plants<sup>20, 21</sup>. Speciation calculations of total Cu and Zn concentrations in -Fe solutions were realized via Visual MINTECQ to in order to keep similar  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  activities similar to those in the

+Fe solutions. All nutrient solutions were continuously aerated and were renewed every two days to avoid nutrient depletion. The experiment was conducted in conditions quite similar the experiment 1 (Weiss et al.<sup>11</sup>), in hydroponics with close compositions of the nutrient solution, i.e. strong chelators like EDTA and similar concentrations in Fe, Zn and Cu, and quite similar durations (42 days and 21 days for experiment 1 and 2 respectively).

## 2.2. Sample preparation

After three weeks, roots and shoots were separated from each other and briefly rinsed with deionized water to eliminate the residual nutrient solution. The samples were weighted and oven-dried at 105 °C for 48 hours. Approximately 0.5 g of the dried samples were digested in a microwave oven (Milestone Ethos Touch Control) with concentrated HNO<sub>3</sub> (15 minutes, 180 °C, 4.10<sup>6</sup> Pa, HNO<sub>3</sub> 67 %) along with blanks and a maize reference material (*Zea mays* L., V463, Bureau InterProfessionnel d'Etudes Analytiques, France, with Cu 4.72 ± 0.54 ppm and Zn 61.19 ± 1.39 ppm). Concentrations of Cu and Zn in the digests were determined by a XII Series ICP-MS from Thermo Fischer Scientific (detection limit around 50 ppt and typical standard deviation of 2 %). Standard river water SLRS4 was run every 10 samples to check the accuracy and the stability of the ICP-MS. The blanks of the digestion process were typically around 9 ppb of Zn and 4 ppb of Cu for minimum concentrations in mineralized plant of 540 ppb of Zn and 126 ppb of Cu. The maize standard gave satisfactory results within expected uncertainties.

For isotopic measurements, Cu and Zn were separated from other elements and from each other by ionic chromatography, following the protocol of Borrok et al.<sup>22</sup> using distilled HNO<sub>3</sub> and HCl acids. Columns were made from 1 mL (resin-holder) and 10 mL poly prep syringes (reservoir). A volume of 0.85 mL of AG MP 1M resin (Biorad) was loaded in the columns and Zn or Cu extraction yields were carefully checked for each sample (atomic absorption spectrometer Solaar Unicam or with the XII series ICP-MS). Prior to Cu and Zn separation, aliquots of samples were evaporated and solubilized in HCl 10 mol.L<sup>-1</sup> for their introduction into the columns. Blanks were below 10 ng of both Cu and Zn for the entire purification procedure.

### 2.3. Isotopic measurements

Cu and Zn isotopic compositions were determined using a MC-ICP-MS (Neptune, ThermoFinnigan) with an APEX HF introduction system. The mass discrimination correction used is described elsewhere (Zn or Cu external doping plus “loose” sample standard bracketing: one standard every two or three samples)<sup>23</sup>. Samples are introduced after addition of Zn (for Cu isotopes measurements) or Cu (for Zn isotopes measurements) as internal standard, with a Cu/Zn ratio of 2, leading to typical concentrations of 200 ppb for Zn and 100 ppb for Cu, in HNO<sub>3</sub> 0.05 mol.L<sup>-1</sup> matrix. Intensities of 40 and 80 V/ppm (at 10<sup>11</sup> W amplification) were measured for <sup>64</sup>Zn and <sup>65</sup>Cu, respectively. The typical <sup>64</sup>Zn and <sup>65</sup>Cu blank during a measurement session was around 1 mV. All our data are expressed relative to our Cu and Zn in-house standard solutions<sup>24</sup> following the delta notation:

$$\delta^{65}\text{Cu} = \left( \frac{\left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{sample}}}{\left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{std}}} - 1 \right) \times 1000 \quad \text{and} \quad \delta^{66}\text{Zn} = \left( \frac{\left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{sample}}}{\left( \frac{{}^{66}\text{Zn}}{{}^{64}\text{Zn}} \right)_{\text{std}}} - 1 \right) \times 1000$$

For better comparison with other studies, isotopic fractionation between two samples A and B can also be expressed as  $\Delta$  with, for example,  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{A-B}} = \delta^{66}\text{Zn}_{\text{A}} - \delta^{66}\text{Zn}_{\text{B}}$ . Total analytical errors for repeated standard analyses associated with these samples give uncertainties for  $\delta^{66}\text{Zn}$  of 0.09‰ and for  $\delta^{65}\text{Cu}$  of 0.07‰. The uncertainty ( $2\sigma$ ) reported for samples in Annex 1 corresponds to the measurements of  $n$  plants cultivated in the same conditions.

### 2.4. Flux uptake modelling

The metal fluxes at consuming biologic interfaces in aquatic systems can be computed with the code FLUXY<sup>25</sup>. The metal flux at the biologic interface depends on the kinetics of i) the absorption of metal by the organism (with an internalization rate  $k_{\text{int}}$ ) and ii) the diffusion/dissociation processes in the solution. In FLUXY computations, the internalization rate is supposed to be very fast compared to the processes in solution. This means that these diffusion-dissociation processes are the rate-limiting factors and that metal complexes in solution will contribute to the absorption flux. FLUXY is also able to compute through two modes of calculation: FLUXY-RS is based on the rigorous solution of equations but is only

valid for 1/1 ML (Metal-Ligand) complexes and FLUXY-RLA is based on an approximation (Reaction-Layer Approximation) but multi-ligand complexes  $ML_n$  are considered, provided that  $ML_n$  ( $n > 1$ ) are in equilibrium with ML. In our case, only FLUXY-RLA will be considered.

The main hypotheses in the FLUXY code are:

- Only free metal can interact with the surface to go through the interface between the plant and the external media.
- The metal of a complex can contribute to the flux but only after the dissociation of the complex at the solution side of the interface.
- The ligand is present in excess compared to the metal.
- The concentrations of all species are supposed to be homogenous in the bulk solution, at any distance greater than the diffusion layer thickness.
- The transfer rate through the membrane is described by Michaelis-Menten kinetics, meaning that the metal flux will be proportional to the surface concentration of transfer sites, to the complexation constant of the metal with these sites ( $K_a$ ) and to the metal internalization rate ( $K_{int}$ ).  $K_a$  (in  $1/\text{mol.L}^{-1}$ ) is related to the Michaelis constant  $K_M$  (in  $\text{mol.L}^{-1}$ ) by the relation:

$$K_a = \frac{1}{K_M}$$

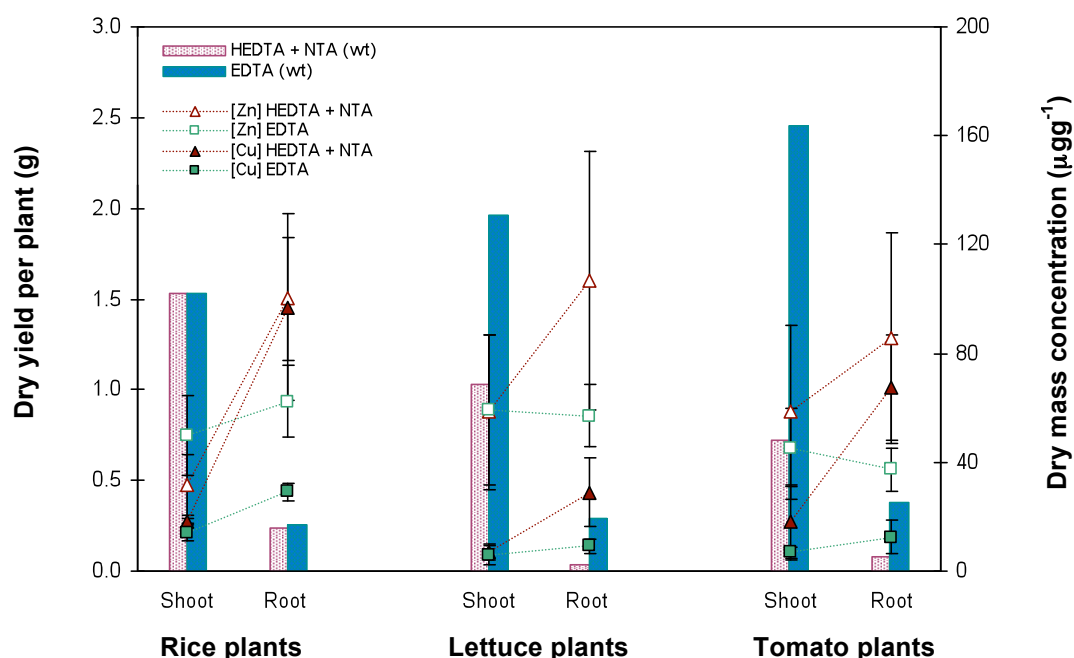
The parameters in the FLUXY code are the composition of the solution (pH, ionic strength, concentration of ions and ligands), the volume of the solution, the diffusion coefficient of all ions, ligands and complexes, the thickness of the diffusion layer around the roots, the concentration of complexing sites, the complexation constant of these sites ( $K_a$  in  $\text{mol}^{-1}$ ), the internalization speed ( $k_{int}$ ), the number of micro-organisms – Fluxy can be applied to plants but also to bacteria, here the number of micro-organisms can be considered as the number of roots – their geometry (planar or spherical) and their radius in case of spherical geometry.  $K_{int}$  and  $K_a$  were adjusted in order to fit the modeled concentrations (from the flux determined by the FLUXY model) and the measured Cu and Zn concentrations in the plants.

### 3. Results

The average Cu and Zn content and isotopic compositions for the two experiments are given in Annex 2. In the following sections, the isotopic ratios are expressed relatively to the nutrient solution in order to easily compare the two series of experiments.

#### 3.1. Biomass and Concentration

##### 3.1.1. First Experiment ((HEDTA+ NTA) or EDTA media)



**Figure 37:** Dry yield (bars) and concentration data (points) for rice, lettuce and tomato root and shoot materials grown during the hydroponic study. Both dry yields and concentration data represent the average values for the experiment replicates grown.  $2\sigma$  errors are presented for the concentration data.

Dry yield data and Cu and Zn concentration data for the hydroponic study of the first experiment are presented in Figure 1. For rice shoot and root materials, dry yields were similar for the (HEDTA + NTA) and EDTA treatments. But, for lettuce and tomato shoots and roots, they were significantly reduced with the (HEDTA + NTA) treatment. This reduction in biomass was more pronounced in root materials, where yields for the (HEDTA + NTA) rootstocks were down to 10% of the EDTA rootstocks. These results complement observations made during the plant growth experiment, where (HEDTA + NTA) cultivated



lettuce and tomato plants exhibited blacken root tips, intervenal scorching of leaves, and marginal browning of leaves.

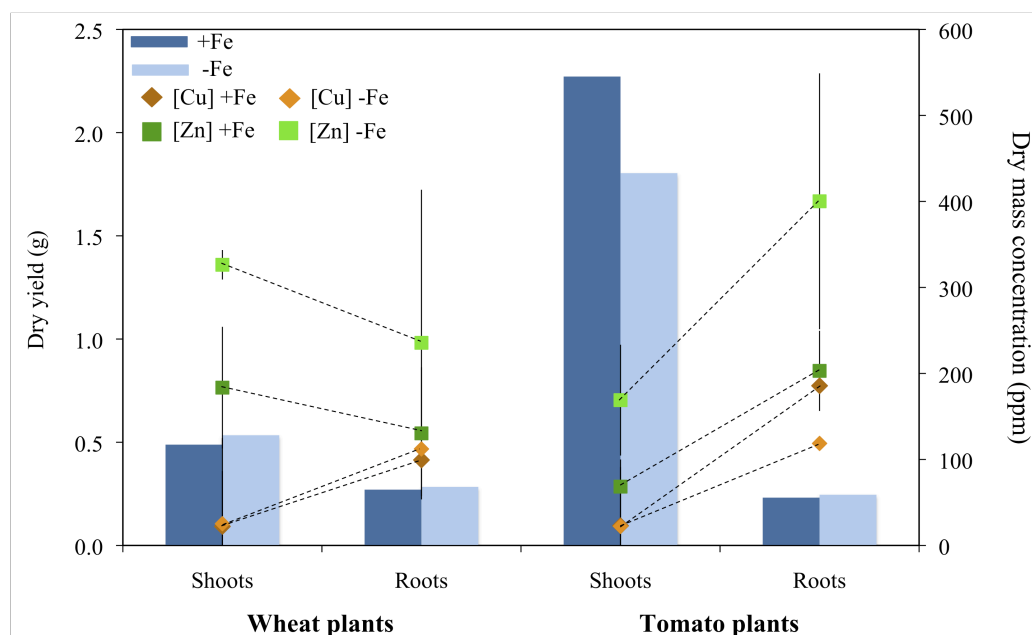
With the EDTA treatment, Cu and Zn concentrations are similar for root and shoot fractions for all the three plant types. Unlike the EDTA treatment, root materials grown in the (HEDTA + NTA) treatment have significantly elevated Cu and Zn concentrations relative to their respective shoots (see Figure 1).

### *3.1.2. Second Experiment (Fe-sufficient and Fe-deficient media)*

Dry biomass yield data and Cu and Zn concentration data wheat and tomato for standard (+Fe) and Fe depleted (-Fe) growth conditions (second experiment) are presented in Figure 2. After 21 days of growth, both plants exhibited greater shoot than root biomass. Wheat and tomato showed similar root biomass but tomato had around four-fold greater shoot biomass than wheat. There is no influence of the nutrient solution conditions (i.e. +Fe and -Fe concentrations) on the root biomass for both plants. In the case of tomato, the shoot biomass was slightly smaller for the Fe depleted growth media than with the standard media (+Fe).

Cu concentration was higher in roots than in shoots for both plant species (Figure 2). Wheat and tomato had similar Cu concentrations in the shoots (around 23 mg of Cu per kg of dry matter) whereas for roots, tomato had a higher Cu concentration in +Fe conditions compared to wheat. Concerning Fe status, both wheat and tomato showed no significant Cu concentration differences. This seemed to indicate that, for our experiments, Cu was not influenced by the Fe status of the plant, i.e. that the Cu uptake occurred through pathways that are different from those for Fe uptake.

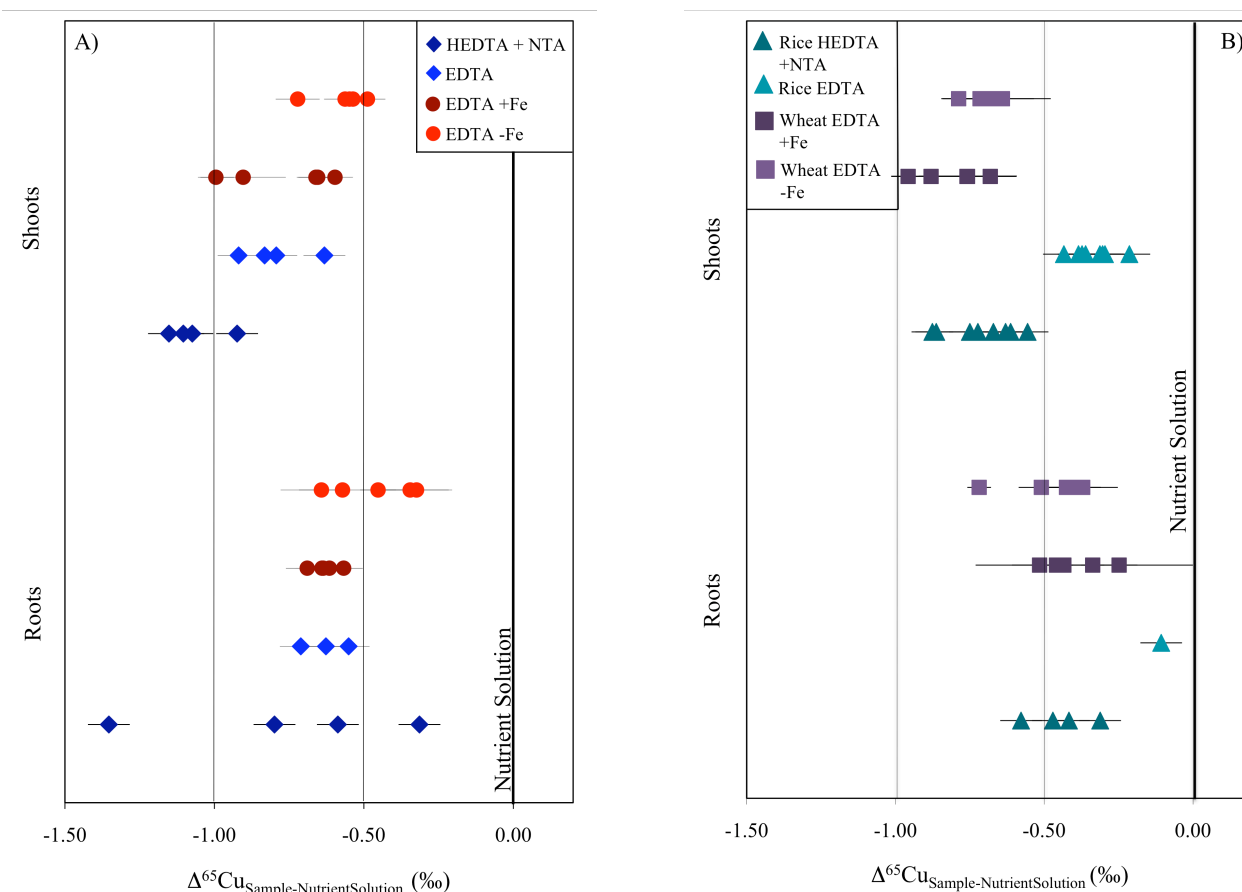
Wheat presented quite similar Zn concentrations between roots and shoots while for tomato, Zn was more concentrated in roots than in shoots (Figure 2). Zn concentration in tomato roots was higher than in wheat roots for both -Fe and +Fe conditions and are lower in shoots. For both plants, the Fe depleted nutrient solution led to a significant increase of Zn concentrations in roots and shoots. Contrary to Cu, Zn uptake was strongly influenced by Fe uptake as well for strategy I tomato plants as for strategy II wheat plants.

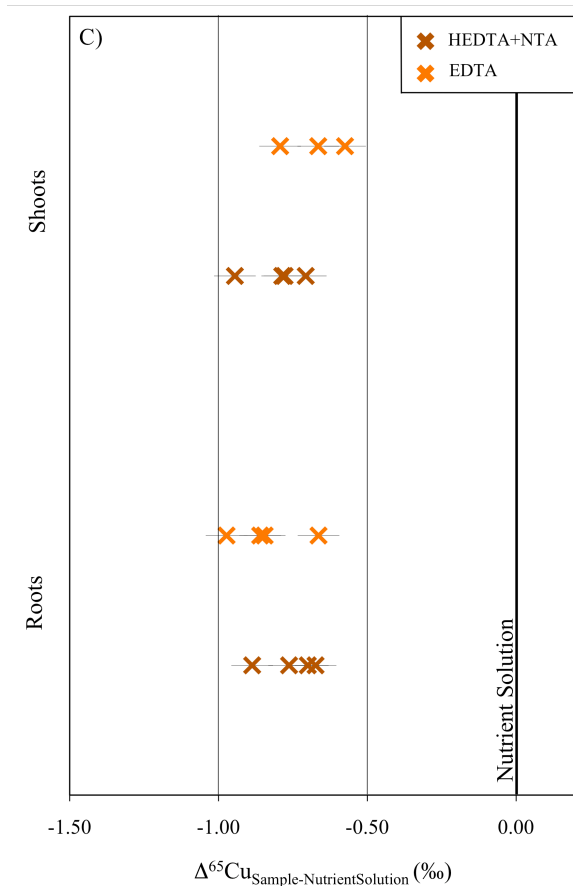


**Figure 38:** Dry matter biomass (bars) and concentration data (points) of the roots and shoots of wheat and tomato plants for + Fe and -Fe growth conditions: - Fe nutrient solution is depleted in Fe compared to the standard (+Fe) nutrient solution.

### 3. Isotopic compositions

#### 3.2.1. Cu





**Figure 39:** Detailed Cu isotopic composition for A) tomato, B) rice and wheat and C) lettuce. The two extreme data (-0.18 and -1.22 ‰) for tomato roots in the HEDTA + NTA conditions were excluded for calculations in Appendix 1 and 2.

For all four plant types, relatively large isotopic depletions in lighter isotopes from nutrient solution to root/shoot materials occurred (of up to  $-0.5 \text{ ‰ amu}^{-1}$  in the case of the tomato shoots grown with the (HEDTA + NTA) nutrient solution), while roots and shoots yielded more similar compositions (see Figure 3).

Rice was the plant that exhibits the smallest isotopic fractionation ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Root-NutrientSolution}}$  of  $-0.11 \pm 0.07 \text{ ‰}$  in the EDTA conditions), whereas lettuce showed the largest fractionation with a  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Root-NutrientSolution}}$  of  $-0.84 \pm 0.26 \text{ ‰}$  in the EDTA conditions. Concerning the isotopic fractionation during translocation, it was mostly not significant within our uncertainties, except for wheat grown in +Fe conditions and rice grown in EDTA conditions. In both cases, lighter isotopes were favored in the shoots compared to the roots ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoot-Root}}$  of  $-0.41 \pm 0.31 \text{ ‰}$  for wheat and  $-0.23 \pm 0.15 \text{ ‰}$  for rice).

Isotopic change due to the different nutrient solutions was only visible for rice, where the  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Root-NutrientSolution}}$  in the EDTA solution was much lower ( $-0.11 \pm 0.07 \text{ ‰}$ ) than in the (HEDTA + NTA) solution ( $-0.45 \pm 0.22 \text{ ‰}$ ).

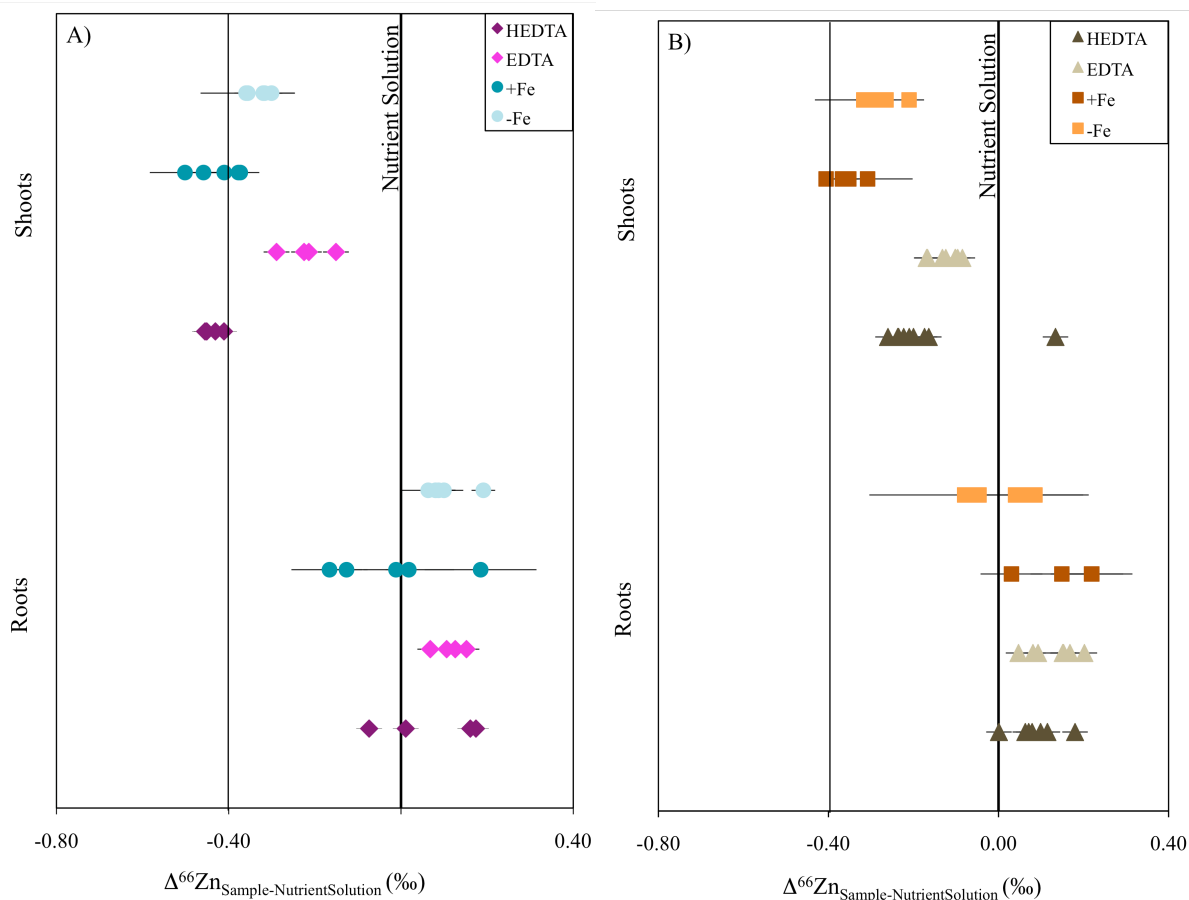
It is interesting to note that Cu isotopic fractionation was similar for tomato for the +Fe and EDTA conditions in the two experiments: large isotopic fractionation between the roots and the nutrient solution favoring light isotope uptake and no fractionation between roots and shoots ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Root-NutrientSolution}}$  of  $-0.63 \pm 0.16 \text{ ‰}$  and of  $-0.63 \pm 0.09 \text{ ‰}$  for experiment 1 and

2, respectively and a  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoot-Root}}$  of  $-0.16 \pm 0.29$  ‰ and of  $-0.13 \pm 0.36$  ‰ for experiment 1 and 2, respectively (See Appendix 2)).

### 3.2.2. Zn

For the first experiment, Zn isotopic results are described in details in Weiss et al<sup>11</sup>.

Zn isotopic ratios for wheat and tomato in the second experiment are represented in Figure 4, together with the results of the first experiment (Weiss et al<sup>11</sup>). No isotopic fractionation within our uncertainties was observed in the roots compared to the nutrient solution with  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Roots-Solution}}$  ranging from -0.02 to 0.15 ‰ for all Fe concentrations. From roots to shoots, Zn lighter isotopes were preferentially translocated and  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Shoots-Roots}}$  varied from -0.29 to -0.51 ‰ with no specific difference between wheat and tomato. No effect of the Fe concentration in the nutrient solution was observed on the isotopic composition of Zn in plants.



**Figure 4:** Detailed Zn isotopic composition for A) tomato (violet for experiment 1 and blue for experiment 2) and B) wheat for experiment 1 (brown) and rice for experiment 2 (orange).

For tomato, in similar nutrient solution (EDTA or +Fe media), experiment 1<sup>11</sup> and 2 gave similar results with a  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Root-Solution}}$  of  $0.11 \pm 0.07 \text{ ‰}$  and of  $-0.02 \pm 0.28 \text{ ‰}$  for experiment 1<sup>11</sup> and 2, respectively and an average  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Shoot-Root}}$  of  $-0.33 \pm 0.13 \text{ ‰}$  and of  $-0.40 \pm 0.30 \text{ ‰}$  for experiment 1 and 2 respectively (See Appendix 2).

## 4. Discussion

### 4.1. Possible effects of blanks and seed reserves on Zn and Cu isotopic fractionations

Because of the potential influence of the copper procedural blank on the  $\delta^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ , it is necessary to determine if the observed shifts in  $\delta^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  between root and nutrient solutions reflect isotopic discrimination within the plant-nutrient solution system, or whether they are artefacts of the copper procedural blank. If the procedural blank were the only source of isotopic variability in the copper data set, a plot of  $\delta^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  against the reciprocals of the quantity of copper processed for each sample will define a single mixing array between the copper isotopic compositions of the procedural blank and nutrient solution (as depicted for the first experiment by the dotted line in Figure 5 (a-c)). For the presented copper isotopic data (first experiment), the majority of data points fall below this mixing line (see Figure 5(a-c)), providing strong evidence for copper isotopic variability within the nutrient solution-plant system. For the second experiment, the blanks are strongly enriched in heavier isotope (around  $+2.0 \text{ ‰ amu}^{-1}$ ) and then cannot explain the depletion in heavier isotopes in the roots and, to a lesser extent, in the shoots of plants compared to the nutrient solution.

During the initial stages of growth, plants derive a significant proportion of nutrients (including Cu and Zn) from their seed. As the rootstock develops and seed reserves dwindle, the dominant source of nutrients switches to the growth media. Analyses of some of the seeds used in the first study indicate significant isotopic differences between the seeds and the growth medias used, particularly for lettuce seeds which are enriched in isotopically heavy Cu

and Zn relative to the bulk nutrient solutions by +0.46 and +0.35 ‰ amu<sup>-1</sup>, respectively (see Appendix 1). However, upon harvest, the proportion of Cu and Zn derived from seed reserves accounted for <3.5 % of the total Cu and Zn budget of all plants studied, with seed reserves of rice being roughly an order of magnitude higher compared to other plants (for both studies). Seed reserves would thus not have significantly affected the Cu and Zn isotopic compositions of the roots and shoots.

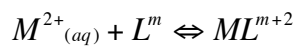
## 4.2. Nutrient Solution-Root interface processes

Different chemical and biological processes at the interface between plant and the growth media will influence the isotopic fractionation of plants. We will discuss here of these processes and how they explain the measured isotopic compositions.

### 4.2.1. Speciation in solution

For each element, many different chemical species coexist in the nutrient solution. Owing to the slight mass-dependency of chemical bond strengths, isotopes of the same element can become unequally distributed between these chemical species during equilibrium reactions<sup>26, 27</sup>. This phenomenon can potentially cause significant isotopic differences between solution-complexed, root-adsorbed and free Cu and Zn fractions.

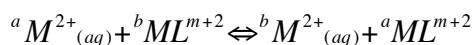
The complexation of Cu and Zn with a ligand L<sup>m</sup> can be written in general terms as:



Where  $m$  is the charge on the dissociated ligand and  $M^{2+}_{(aq)}$  represents the aqueous metal complex  $[M(H_2O)_6]^{2+}$ . The chemical equilibrium constant  $K$  for this reaction is defined as:

$$K = \frac{[ML^{m+2}]}{[M^{2+}][L^m]}$$

The corresponding isotopic exchange reaction for  $^aM^{2+}$  and  $^bM^{2+}$  is:



where  $a$  and  $b$  represent different isotopes of the same metal  $M$ . The corresponding isotopic equilibrium constant  $K'$  is:

$$K' = \frac{\left[ {}^a ML^{m+2} \right] \left[ {}^b M^{2+} \right]}{\left[ {}^a M^{2+} \right] \left[ {}^b ML^{m+2} \right]}$$

Heavy isotopes are preferentially partitioned into the complex with the strongest covalent character<sup>27</sup>. EDTA, HEDTA and NTA form strong covalent bonds with Cu and Zn, in contrast to H<sub>2</sub>O, which forms relatively weak bonds. Thus, chelated Cu and Zn are predicted to evolve isotopically towards heavier compositions, while free Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> will tend towards isotopically lighter values relative to the bulk nutrient solution. Because the magnitude of the isotopic difference between the chelated and free metal species increases with increasing covalent character of the ligand involved, the largest isotopic effects are predicted for EDTA (pK of 16.5 for Zn) followed by HEDTA (pK of 14.6 for Zn) and then NTA (pK of 10.3 for Zn), pK values for the zinc complex at 25°C with a background electrolyte of 0.1 mol.dm<sup>-3</sup> 28, 29.

The speciation in the different nutrient solutions can be found in Table 1 and Table 2 for the first and second experiments respectively. In all nutrient solutions, Cu speciation is dominated by the EDTA species, while free Cu<sup>2+</sup> ions represent less than 0.5% of the total speciation. Zn has a more contrasted behavior, where free Zn<sup>2+</sup> ions represent 0.03, 3.78 and 40 % of total Zn for the HEDTA + NTA or the +Fe nutrient solutions or the EDTA/-Fe solutions, respectively.

The balance of the equilibrium reaction also influences the isotopic compositions of chelated and free metal species within the nutrient solution. For large excess of chelators, as with the HEDTA+NTA or the +Fe nutrient solution, chelated metal species dominate the metal budget of the solution. Owing to mass balance constraints and predicted isotope fractionation, the chelated metal fractions have isotopic compositions similar to the bulk nutrient solution, while the free metal fractions have isotopically light compositions. When the chelated metal and free metal are in equal proportions in solution, as for Zn in the EDTA or -Fe nutrient solutions, the chelated metal fraction will have isotopically heavy signatures and the free metal fraction isotopically light signatures relative to the bulk nutrient solution, although here the isotopic fractionation towards negative values in the free metal pool will be smaller than with chelators in excess.

Membrane uptake of Cu and Zn is species dependant and still a question of debate. The free metal ions are supposed to be the predominant species taken up by plants, especially for strategy I plants, as tomato and lettuce. Specific metal-chelators released by plants (e.g. Zn-phytosiderophores<sup>18</sup>) can also be taken up by strategy II plants. However, in our experiments, free metal ions, especially Cu, were in too low concentrations to be the only species contributors to the flux to the plants.

The Fluxy code was used in the second experiment in order to determine metal fluxes from the nutrient solution to the plant. The fluxes into plants of the different aqueous species of Cu and Zn are reported in Table 3, along with the chosen parameters for the model. What is noteworthy is that, according to the Fluxy code, the main species that participate to the flux of metal taken up by plants are not the dominant species in the solution. In spite of the predominant proportion of EDTA complexes in the solution, their contributions to metal fluxes in the plants were negligible because of their lack of lability in comparison with inorganic complexes. As a consequence, the main species contributing to the amount of metals taken up by the plants would be, for Zn, the free metal  $\text{Zn}^{2+}$ , whereas for Cu it would mainly by  $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{aq})$  and  $\text{CuCO}_3(\text{aq})$ . Other species, like  $\text{ZnCO}_3$ ,  $\text{ZnOH}^+$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CuOH}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  could also contribute to the flux, although to a lesser extent. Even though the speciation in solution changed between +Fe and –Fe conditions, the species taken up remain identical in both conditions. And yet, the isotopic signatures of these species are still unknown. However, a number of features of the data set are inconsistent with the only isotopic partitioning in the solution. Cu has very analogous speciation in all nutrient solutions while Zn has contrasting speciation. In spite of the different speciations, only rice exhibits differences of isotopic signatures between the nutrient solutions for Cu and Zn. The complexation of metal ions in the nutrient solution does not seem to be the only process responsible of isotopic fractionation during plant uptake.

#### 4.2.2. Adsorption on the root's surface

It is well documented that metal cations strongly bind to root cell wall components (i.e. at the outer surfaces of root cells) via adsorption/surface complexation processes, as shown for Cu in wheat and tomato by Chaignon et al.<sup>30</sup> and Cornu et al.<sup>20</sup> or for Zn by Straczek et al.<sup>31</sup>. For metal ions, adsorption onto the root surface, as for adsorption on mineral surfaces or organic



matter<sup>6, 32-35</sup>, should favor the sorption of heavier isotopes on the root surfaces and the enrichment of lighter isotopes in the solution. Nonetheless, these processes should happen for both Cu and Zn and could not alone explain the difference of isotopic fractionation between roots and solution for the two elements.

#### 4.2.3. Membrane uptake

So far the discussion has focused on abiotic processes that control Cu and Zn phytoavailability. Cu and Zn isotopes may also fractionate during biochemical reactions occurring within the root-nutrient solution system. The exact mechanisms controlling Cu and Zn transport across the plasmalemma still remains the matter of much debate. Experimental studies on giant algal (*Chara corallina*) cells have shown that Zn uptake is biphasic, with high- and low-affinity Zn uptake pathways<sup>36</sup>. Furthermore, hydroponic growth experiments with wheat plants have proposed a high- and low-affinity uptake mechanism for Zn in higher plants<sup>37, 38</sup>. In both cases, it is thought to be metabolically controlled and to involve some combination of ion channels and/or electrogenic pumps for the low-affinity pathways and carrier proteins for high-affinity pathways. Transport through ion channels or via electrogenic pumps will favour the light isotope because of its greater diffusion coefficient. Conversely, the high-affinity transport should favour the heavy isotope because it involves covalent binding to a carrier protein on the outer side of the membrane.

The high-affinity pathways of Cu and Zn are still not well defined. Several ZIP transporters (Zinc-Regulated Transporter and Iron-Regulated Transporter like Proteins) have been described for Zn uptake in *Arabidopsis*<sup>39-41</sup> and maize<sup>42, 43</sup>. Furthermore, it has been demonstrated that maize is able to absorb Zn-phytosiderophore (Zn-PS) complexes<sup>18</sup> and that PS will be more exuded under Zn-deficient conditions for barley and wheat<sup>19, 44</sup>. However, these results are challenged by Gries et al.<sup>45</sup> and by Pedler et al.<sup>46</sup> emphasizing that some of these results seemed to be method-dependant. For Cu, it is less documented but it seems that Cu has specific transporters COPT1 (Copper Transporter), which were described in *Arabidopsis*<sup>47</sup>. Because Cu reduction seems necessary for the COPT1 uptake, Puig et al.<sup>48</sup> suggested that Cu might be reduced by the ferric reductase FRO (Ferric Reductase Oxydase). A specific Cu reductase was discovered under Cu deficiency for red clover<sup>49</sup> even though its physiological function has not been made clear in this study. The ZIP family of transporters

seems also to be partly involved in Cu uptake by *Arabidopsis*<sup>41, 50</sup>. For strategy II plant species, Chaignon et al<sup>30</sup> and Michaud et al<sup>21</sup> suggested that Cu could also be internalized via phytosiderophores in low-Fe/high-Cu concentrations.

There is still to establish which uptake pathway has been used for Cu and Zn by the plants in our study and what it does imply for isotopic fractionation. First, it was noticed that high- and low-affinity strategies depend on the concentration of free ions in the nutrient solution. In Wang et al.<sup>38</sup> study, high affinity occurs at low  $\text{Zn}^{2+}$  concentration (below  $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  of  $\text{Zn}^{2+}$ ), while low-affinity transport is observed above  $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ . Hacisalihoglu et al.<sup>37</sup> found a lower threshold for Zn uptake, at  $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ . In the first experiment, free  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations are comprised between  $1.9 \cdot 10^{-13}$  and  $2.8 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$  and  $4.1 \cdot 10^{-10}$  and  $2.1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ , respectively. In the second experiment, free  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations ranged between  $2.5 \cdot 10^{-9}$  and  $1.3 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$  and between  $6.5 \cdot 10^{-8}$  and  $2.8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ , respectively. In this regard, Cu uptake is probably due to high-affinity transporters, while for Zn, low- and high-affinity uptake may be invoked for the two experiments, depending on the nutrient solution considered.

Moreover, it is worth noticing that in the second experiment, Zn uptake seems to correlate with Fe uptake, as Zn concentration in plants increase with lower Fe concentration in the nutrient solution. Zn might then be taken up by ZIP transporters and/or phytosiderophores, but the isotopic fractionation associated with these transporters is still unknown. Following the isotopic signatures measured in our experiments, it should not be accompanied by a very important isotopic fractionation. The effect of Fe concentration in the nutrient solution was not observed for Cu, implying different uptake pathways for Cu than for Zn and Fe. Because abiotic experiments<sup>51</sup> have shown that reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{Cu}^{+}$  induce light isotope enrichments in the reduced species, and as specific Cu transporters are supposed to take up reduced  $\text{Cu}^{+}$ , the negative shift in our data can reflect the reductase-induced reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  species to  $\text{Cu}^{+}$  with the preferential incorporation of the isotopically light  $\text{Cu}^{+}$  metal into the root structure.

#### **4.3. Translocation (transfer from roots to shoots)**

Having been taken across the root plasmalemma, Cu and Zn are redistributed through the plant within the xylem. The xylem consists of a network of dead cells and is primarily

responsible for transporting nutrients and water from roots and shoots. The walls of the xylem are covered in ion-exchange sites and then trace-metal transport is controlled by ion-exchange reactions with these charged sites<sup>52</sup>. Furthermore, transport of di- or tri-valent cations within the xylem is significantly enhanced by complexation by organic acids, amino acids or peptides produced by the plants<sup>53</sup>. Other metal transport can occur within the phloem, which is an interconnected network of living cells, which transports nutrients within plants from areas of surplus nutrients (e.g. active photosynthesising cells) to areas requiring additional nutrient input (e.g. developing seeds and fruits). As with the xylem, metals are predominantly transported as organic complexes<sup>54</sup>. Unlike the xylem, however, the phloem sources metals from cells within the roots and shoots<sup>55</sup> and thus, metals transported through the phloem have undergone various degrees of cellular processing. In general, it is expected that nicotianamine should complex all Cu and Zn in the phloem and about 50% of Zn and all Cu in the xylem<sup>18, 56</sup>. Moreover, for tomato, specific measurements have demonstrated that nicotianamine was responsible for Cu transport in the xylem<sup>57</sup>.

During translocation, lighter isotopes seem to be favored in the shoots compared to the roots in most plants. This is very clear for Zn where  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Shoots-Roots}}$  varies between  $-0.25 \pm 0.12$  ‰ and  $-0.51 \pm 0.24$  ‰. Most results are however within analytical uncertainties for Cu, except for wheat in +Fe conditions, rice in the EDTA conditions and tomato in the HEDTA+NTA conditions with a  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoots-Roots}}$  of  $-0.41 \pm 0.31$  ‰,  $-0.23 \pm 0.15$  ‰, and  $-0.37 \pm 0.36$  ‰, respectively. The distribution of metals in the plants could influence the isotopic shift during translocation: when larger amounts of metal are translocated, less fractionation occurs, due to mass balance effects. However, this effect cannot account for the similar isotopic fractionation in our samples, with different proportions of metals in the shoots and conversely.

If Cu and Zn transfers through the plant are not quantitative, preferential transport of isotopically distinct complex metal species relative to free metal ions can potentially lead to a net isotopic difference between root and shoot materials. Kinetic effects during complexation of Cu and Zn can also influence their isotopic signatures and lead to an enrichment of lighter isotopes in the shoots. However, the effect of different growth conditions in our experiments cannot be distinguished within our analytical uncertainties, and Cu measurements have larger uncertainties than Zn, which may lead to underestimate the isotopic fractionation for Cu during translocation.

## **Conclusion**

This study reports the first data of Cu isotopic compositions in hydroponically-grown plants. The isotopic behaviour of Cu differs of that of Zn, with root materials exhibiting isotopically light compositions relative to the bulk nutrient solutions, in contrast to Zn, where the roots yield no isotopic fractionation or slightly heavy compositions relative to the bulk nutrient solutions. Isotopic compositions in plants are dependent on many processes (adsorption on the roots, reduction-oxidation processes, diffusion, complexation with transporters, etc) that are influenced by the plant species, the stage of growth of the plant, the nutrition status of the plants, different nutrient medium... The decoupled behaviour between Cu and Zn is consistent with the reduction of chelated-Cu<sup>2+</sup> at the root membrane during plant uptake. However additional laboratory experiments are needed in order to test different growth conditions to better constrain the relative effects of i) metal uptake strategy of plants, ii) metal speciation in solution (ligands with different lability properties), iii) stage of growth of the plant, etc... Experiments over longer periods of time covering the entire cycle of plants and the formation of grains or fruits could lead to different isotopic fractionations. Perennial plants like trees integrate processes over longer time frames and might lead to even more complicated isotopes metal behavior.

### Literature Cited

1. Mehra A.; Farago M. E., Metal ions and plant nutrition. In *Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*, Farago M. E., Ed. VCH: 1994; pp 31-66.
2. Van Campen D. R., Trace elements in human nutrition. In *Micronutrients in agriculture*, Mordvedt J. J.; Cox F. R.; Shuman L. M.; Welch R. M., Eds. Soil Science Society of America: 1991; pp 663-701.
3. Nriagu J. O., A silent epidemic of environmental metal poisoning. *Environmental Pollution* **1988**, 50, 139-161.
4. Nriagu J. O., Global metal pollution - poisoning the biosphere. *Environment* **1990**, 32, 6-&.
5. Zhu Z. K.; Guo Y.; Williams R. J. P.; O'Nions R.K.; Matthews A.; Belshaw N. S.; Canters G. W.; de Waal E. C.; Weser U.; Burgess B. K.; Salvato B., Mass fractionation processes of transition metal isotopes. *Earth and Planetary Science Letters* **2002**, 200, 47-62.
6. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Emnova E. E.; Kompantseva E. I.; Freydier R., Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hydr)oxides: Possible structural control. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 1742-1757.
7. Mathur R.; Ruiz J.; Titley S.; Liermann L.; Buss H.; Brantley S., Cu isotopic fractionation in the supergene environment with and without bacteria. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2005**, 69, 5233-5246.
8. Kimball B. E.; Mathur R.; Dohnalkova A. C.; Wall A. J.; Runkel R. L.; Brantley S. L., Copper isotope fractionation in acid mine drainage. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2009**, 73 (5), 1247-1263.
9. Gélabert A.; Pokrovsky O. S.; Viers J.; Schott J.; Boudou A.; Feurtet-Mazel A., Interaction between zinc and freshwater and marine diatom species : Surface complexation and Zn isotope fractionation. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, 70, 839-857.
10. John S. G.; Geis R. W.; Saito M. A.; Boyle E. A., Zinc isotope fractionation during high-affinity and low-affinity zinc transport by the marine diatom *Thalassiosira oceanica*. *Limnology and Oceanography* **2007**, 52, 2710-2714.
11. Weiss D. J.; Mason T. F. D.; Zhao F. J.; Kirk G. J. D.; Coles B. J.; Horstwood M. S. A., Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytologist* **2005**, 165, 703-710.
12. Moynier F.; Pichat S.; Pons M-L.; Fike D.; Balter V.; Albarède F., Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chemical Geology* **2009**, 267, 125-130.

13. Viers J.; Oliva P.; Nonell A.; Gélabert A.; Sonke J. E.; Freydier R.; Gainville R.; Dupré B., Evidence of Zn isotopic fractionation in a soil-plant system of a pristine tropical watershed (Nsimi, Cameroon). *Chemical Geology* **2007**, *239*, 124-137.
14. Guelke M.; Von Blanckenburg F., Fractionation of stable iron isotopes in higher plants. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 1896-1901.
15. Marschner H.; Römheld V., Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* **1994**, *165*, 261-274.
16. Welch R. M., Zinc concentrations and forms in plants for humans and animals. In *Zinc in Soil and Plants*, Robson A. D., Ed. Kluwer Academic Publishers: 1993; pp 183-195.
17. Welch R. M., Micronutrient nutrition of plants. *Critical reviews in Plant Sciences* **1995**, *14*, 49-82.
18. Von Wirén N.; Marschner H.; Römheld V., Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc. *Plant Physiology* **1996**, *111*, 1119-1125.
19. Cakmak I.; Sari N.; Marschner H.; Ekiz H.; Kalayci M.; Yilmaz A.; Braun H. J., Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant and Soil* **1996**, *180*, 183-189.
20. Cornu J-Y.; Staunton S.; Hinsinger P., Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant and Soil* **2007**, *292*, 63-77.
21. Michaud A. M.; Chappellaz C.; Hinsinger P., Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant and Soil* **2008**, *310*, 151-165.
22. Borrok D. M.; Nimick D. A.; Wanty R. B.; Ridley W. I., Isotopic variations of dissolved copper and zinc in stream waters affected by historical mining. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *72* (2), 329-344.
23. Jouvin D.; Louvat P.; Maréchal C. N.; Juillot F.; Benedetti M. F., Zn isotopic fractionation: why organic matters. *Environmental Science and Technology* **2009**, *In revision*.
24. Chen J.; Louvat P.; Gaillardet J.; Birck J-L., Direct separation of Zn from dilute aqueous solutions for isotope composition determination using multi-collector ICP-MS. *Chemical Geology* **2008**, *In press*.
25. Zhang Z.; Buffle J.; Startchev K.; Alemani D., Fluxy: A simple code for computing steady-state metal fluxes at consuming (bio)interfaces, in natural waters. *Environmental Chemistry* **2008**, *5*, 204-217.
26. Urey H. C., The thermodynamics properties of isotopic substances. *Journal of the Chemistry Society* **1947**, 562-581.
27. Schauble E. A., Applying stable isotope fractionation theory to new systems. In *Geochemistry of non-traditional stable isotopes*, Johnson C. M.; Beard B. L.; Albarède F., Eds. Reviews in Mineralogy and Geochemistry: 2004; Vol. 55, pp 65-111.

28. Field T. B.; McBryde W. A.E., Apparent stability constants of proton and metal ion complexes of glycine, iminodiacetic acid, nitrilotriacetic acid, and triethylenetetramine in aqueous methanol. *Canadian Journal of Chemistry* **1981**, *59*, 555-558.
29. Smith R. M.; Martell A. E., *Critical stability constants*. Plenum Press: 1989.
30. Chaignon V.; Di Malta D.; Hinsinger P., Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist* **2002**, *154*, 121-130.
31. Straczek A.; Sarret G.; Manceau A.; Hinsinger P.; Geoffroy N.; Jaillard B., Zinc distribution and speciation in roots of various genotypes of tobacco exposed to Zn. *Environmental and Experimental Botany* **2008**, *63*, 80-90.
32. Balistrieri L. S.; Borrok D. M.; Wanty R. B.; Ridley W. I., Fractionation of Cu and Zn isotopes during adsorption onto amorphous Fe(III) oxyhydroxide: Experimental mixing of acid rock drainage and ambient river water. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *72*, 311-328.
33. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Freyrier R., Zinc stable isotope fractionation during its adsorption on oxides and hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *291*, 192-200.
34. Juillot F.; Maréchal C.; Ponthieu M.; Cacaly S.; Morin G.; Benedetti M.; Hazemann J.L.; Proux O.; Guyot F., Zn isotopic fractionation caused by sorption on goethite and 2-Lines ferrihydrite. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *72*, 4886-4900.
35. Jouvin D.; Louvat P.; Maréchal C. N.; Juillot F.; Benedetti M. F., Zn isotopic fractionation: why organic matters. *Environmental Science and Technology* **2009**, *43*, 5747-5754.
36. Reid R. J.; Brookes J. D.; Tester M. A.; Smith F. A., The mechanism of zinc uptake in plants. *Planta* **1996**, *198*, 39-45.
37. Hacisalihoglu G.; Hart J. J.; Kochian L. V., High- and low-affinity zinc transport systems and their possible role in zinc efficiency in bread wheat. *Plant Physiology* **2001**, *125*, 456-463.
38. Wang P.; Zhou D. M.; Luo X. S.; Li L. Z., Effects of Zn-complexes on zinc uptake by wheat (*Triticum aestivum*) roots: a comprehensive consideration of physical, chemical and biological processes on biouptake. *Plant and Soil* **2009**, *316*, 177-192.
39. Grotz N.; Guerinot M. L., Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, *1763*, 595-608.
40. Guerinot M. L., The ZIP family of metal transporters. *Biochimica and Biophysica Acta* **2000**, *1465*, 190-198.
41. Grotz N.; Fox T.; Connolly E.; Park W.; Guerinot M. L.; Eide D., Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 220-224.

42. Chen W. R.; Feng Y.; Chao Y. E., Genomic analysis and expression pattern of OsZIP1, OsZIP3 and OsZIP4 in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different zinc efficiency. *Russian Journal of Plant Physiology* **2008**, *55*, 400-409.
43. Ishimaru Y.; Suzuki M.; Kobayashi T.; Takahashi M.; Nakanishi H.; Mori S.; Nishizawa N. K., OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *Journal of Experimental Biology* **2005**, *56*, 3207-3214.
44. Suzuki M.; Takahashi M.; Tsukamoto T.; Watanabe S.; Matsubashi S.; Yazaki J.; Kishimoto N.; Kikuchi S.; Nakanishi H.; Mori S.; Nishizawa N. K., Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. *The Plant Journal* **2006**, *48*, 85-97.
45. Gries D.; Brunn S.; Crowley D.; Parker D. R., Phytosiderophore release in relation to micronutrient metal deficiencies in barley. *Plant and Soil* **1995**, *172*, 299-308.
46. Pedler J. F.; Parker D. R.; Crowley D. E., Zinc deficiency-induced phytosiderophore release by the Triticaceae is not consistently expressed in solution culture. *Planta* **2000**, *211*, 120-126.
47. Sancenon V.; Puig S.; Mateu-Andrés I.; Dorcey E.; Thiele D. J.; Penarrubia L., The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (15), 15348-15355.
48. Puig S.; Andrès-Colas N.; Garcia-Molina A.; Penarrubia L., Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment* **2007**, *30*, 271-290.
49. Zheng S. J.; He Y. F.; Arakawa Y.; Masaoka Y.; Tang C., A copper-deficiency-induced root reductase is different from the iron-deficiency-induced one in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant and Soil* **2005**, *273*, 69-76.
50. Wintz H.; Fox T.; Wu Y.-Y.; Feng V.; Chen W.; Chang H.-S.; Zhu T.; Vulpe C., Expression profiles of Arabidopsis thaliana in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 47644-47653.
51. Ehrlich S.; Butler I.; Halicz L.; Rickard D.; Oldroyd A.; Matthews A., Experimental study of the copper isotope fractionation between aqueous Cu(II) and covellite, CuS. *Chemical Geology* **2004**, *209*, 259-269.
52. Sattelmacher B., The apoplast and its significance for plant nutrition. *New Phytologist* **2001**, *149*, 167-192.
53. Clark C. J.; Holland P. T.; Smith G. S., Chemical composition of bleeding xylem sap from kiwifruit vines. *Annals of Botany* **1986**, *58*, 353-362.
54. Schmidke I.; Stephan U. W., Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **1995**, *95*, 147-153.
55. Pearson J. N.; Rengel Z.; Jenner C. F.; Graham R. D., Transport of zinc and manganese to developing wheat grains. *Physiologia Plantarum* **1995**, *95* (449-455).



56. Von Wirén N.; Klair S.; Bansal S.; Briat J-F.; Khodr H.; Shiori T.; Leigh R. A.; Hider R. C., Nicotianamine chelates both Fe(III) and Fe(II). Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* **1999**, *119*, 1107-1114.
57. Pich A.; Scholz G., Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-simulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany* **1996**, *47*, 41-47.
58. Parker D. R.; Norwell W. A.; Chaney R. L., GEOCHEM-PC: A chemical speciation program for IBM and compatible personal computers. In *Soil chemical equilibrium and reaction models*, Loeppert R. H., Ed. SSSA Special Publication: 1995; Vol. 42, pp 253-269.
59. Bravin M. N.; Le Merrer B.; Denaix L.; Schneider A.; Hinsinger P., Copper uptake kinetic in hydroponically-grown durum wheat as compared with soil's ability to supply Cu. *In prep for Plant and Soil*.

# Appendix 1

				Cu content	Zn content	$\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Plant-NutrientSolution}}$			$\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Plant-NutrientSolution}}$				
				$\mu\text{g}$	$\mu\text{g}$	$\text{‰}$	$2\sigma$	n	$\text{‰}$	$2\sigma$	n		
Experiment 1	Rice	EDTA	Roots	7.8	15.9	-0.11	0.07	1	0.13	0.10	1		
			Shoots	21.9	76.6	-0.34	0.14	4	-0.12	0.06	4		
		HEDTA	Roots	22.9	24.4	-0.45	0.22	3	0.09	0.11	3		
			Shoots	27.6	51.4	-0.71	0.23	4	-0.21	0.07	4		
	Lettuce	EDTA	Roots	2.7	16.7	-0.84	0.26	4	0.15	0.08	4		
			Shoots	11.2	115.6	-0.68	0.22	3	-0.21	0.05	3		
		HEDTA	Roots	1.0	3.5	-0.76	0.19	4	0.16	0.09	4		
			Shoots	7.0	56.4	-0.80	0.20	4	-0.32	0.06	4		
	Tomato	EDTA	Roots	4.7	14.0	-0.63	0.16	3	0.11	0.07	3		
			Shoots	16.8	111.5	-0.79	0.24	4	-0.22	0.11	4		
HEDTA		Roots	6.1	10.1	-0.69	0.30	2	0.07	0.24	4			
		Shoots	13.0	42.2	-1.06	0.20	4	-0.44	0.04	4			
Experiment 2	Wheat	+Fe	Roots	27.4	36.3	-0.40	0.21	5	0.15	0.18	4		
			Shoots	10.9	90.4	-0.81	0.22	5	-0.36	0.07	5		
		-Fe	Roots	31.7	66.7	-0.48	0.28	5	0.01	0.14	5		
			Shoots	13.5	174.5	-0.71	0.12	4	-0.28	0.08	5		
	Tomato	+Fe	Roots	42.4	46.4	-0.63	0.09	5	-0.02	0.28	5		
			Shoots	52.1	155.7	-0.76	0.35	5	-0.42	0.11	5		
		-Fe	Roots	28.6	100.3	-0.47	0.28	5	0.10	0.10	5		
			Shoots	40.3	307.1	-0.57	0.18	5	-0.33	0.05	5		
$\delta^{65}\text{Cu}$								$\delta^{66}\text{Zn}$					
$\text{‰}$								$\text{‰}$	$2\sigma$	n	$\text{‰}$	$2\sigma$	n
Seeds	Exp 1	Rice		0.2	2.6	-0.07			0.06	0.11			
		Lettuce		0.0	0.1	1.05			0.72	0.03			
		Tomato		0.2	2.6								
	Exp 2	Wheat		0.1	1.0								
		Tomato		0.1	0.3								
Nutrient Solution	Exp 1	EDTA				0.14	0.07		0.03	0.03			
		HEDTA				0.15	0.07		0.05	0.03			
	Exp 2	+Fe				-0.51	0.09	4	0.26	0.08	5		
		-Fe				-0.25	0.08	2	0.22	0.08	3		

Biomass, concentration and isotopic measurements for the two experiments discussed in this study. n corresponds to the number of samples, i.e. for plants: it corresponds to the measurements of n grown and acid-digested plants and for the nutrient solution, to the number of purification procedure. All purified samples were measured at least two times on the MC-ICP-MS. In order to easily compare the different experiments, the results for roots and shoots are already normalized from the isotopic signatures of the nutrient solutions and expressed as  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Plant-NutrientSolution}}$  or  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Plant-NutrientSolution}}$ . The isotopic compositions of the different nutrient solutions are expressed at the bottom of the table.

## Appendix 2

	Cu											
	Tomato				Wheat				Rice			
	+Fe 2σ	-Fe 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ	+Fe 2σ	-Fe 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ
Δ <sub>Roots-NutrientSolution</sub>	-0.63 0.09	-0.47 0.28	-0.63 0.16	-0.69 0.30	-0.40 0.21	-0.48 0.28	-0.11 0.07	-0.45 0.22	-0.84 0.26	-0.76 0.19		
Δ <sub>Shoots-Roots</sub>	-0.13 0.36	-0.10 0.33	-0.16 0.29	-0.37 0.36	-0.41 0.31	-0.22 0.31	-0.23 0.15	-0.27 0.32	0.16 0.34	-0.05 0.28		

	Zn											
	Tomato				Wheat				Rice			
	+Fe 2σ	-Fe 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ	+Fe 2σ	-Fe 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ	EDTA 2σ	HEDTA 2σ
Δ <sub>Roots-NutrientSolution</sub>	-0.02 0.28	0.10 0.10	0.11 0.07	0.07 0.24	0.15 0.18	0.01 0.14	0.13 0.10	0.09 0.11	0.15 0.08	0.16 0.09		
Δ <sub>Shoots-Roots</sub>	-0.40 0.30	-0.43 0.11	-0.33 0.13	-0.51 0.24	-0.51 0.19	-0.29 0.16	-0.25 0.12	-0.31 0.12	-0.36 0.09	-0.48 0.10		

Isotopic fractionation between the different parts of plants and/or the nutrient solution, for the two experiments, expressed as  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{A-B}}$  (or  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{A-B}}$ ):  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{A-B}} = \delta^{65}\text{Cu}_{\text{A}} - \delta^{65}\text{Cu}_{\text{B}}$ .

<i>HEDTA + NTA Nutrient Solution</i>			<i>Proportion of each metal species in solution (%).</i>							
<b>Metal</b>	<b>Conc. (M)</b>	<b>Free ion activity</b>	<b>Free metal</b>	<b>SO<sub>4</sub></b>	<b>Cl</b>	<b>PO<sub>4</sub></b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>HEDTA</b>	<b>NTA</b>	<b>MES</b>
Ca <sup>2+</sup>	1.00E-03	4.91E-04	81.18	14.98	0.01	0.25	<0.01	0.08	2.54	0.95
Mg <sup>2+</sup>	1.64E-03	8.48E-04	85.51	12.54	0.12	0.22	<0.01	<0.01	0.34	1.26
K <sup>+</sup>	4.99E-03	4.34E-03	98.76	1.2	0.04	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Na <sup>+</sup>	4.00E-07	3.49E-07	99.03	0.76	0.2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Fe <sup>3+</sup>	2.00E-04	8.72E-16	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	85.17	14.83	<0.01
Mn <sup>2+</sup>	2.00E-05	3.94E-06	32.63	6.02	0.2	<0.01	<0.01	47.91	12.85	0.38
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>5.00E-07</b>	<b>1.86E-13</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>90.35</b>	<b>9.65</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>2.00E-06</b>	<b>4.10E-10</b>	<b>0.03</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>78.82</b>	<b>21.14</b>	<b>&lt;0.01</b>

<i>EDTA Nutrient Solution</i>			<i>Proportion of each metal species in solution (%).</i>							
<b>Metal</b>	<b>Conc. (M)</b>	<b>Free ion activity</b>	<b>Free metal</b>	<b>SO<sub>4</sub></b>	<b>Cl</b>	<b>PO<sub>4</sub></b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>EDTA</b>	<b>OH<sup>-</sup></b>	<b>MES</b>
Ca <sup>2+</sup>	1.00E-03	5.06E-04	83.48	15.37	0.01	0.15	<0.01	<0.01	<0.01	0.98
Mg <sup>2+</sup>	1.64E-03	8.55E-04	85.92	12.57	0.11	0.13	<0.01	<0.01	<0.01	1.27
K <sup>+</sup>	4.99E-03	4.35E-03	98.76	1.2	0.04	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Na <sup>+</sup>	4.00E-07	3.50E-07	99.06	0.76	0.18	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Fe <sup>3+</sup>	1.00E-04	3.19E-15	<0.01	<0.01	<0.01	40.95	<0.01	19.21	39.83	<0.01
Mn <sup>2+</sup>	2.00E-05	1.01E-05	82.95	15.27	0.46	<0.01	<0.01	0.34	<0.01	0.97
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>1.50E-07</b>	<b>2.79E-10</b>	<b>0.31</b>	<b>0.07</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>99.61</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>1.00E-06</b>	<b>2.14E-07</b>	<b>35.25</b>	<b>6.49</b>	<b>0.12</b>	<b>0.19</b>	<b>0.08</b>	<b>57.39</b>	<b>0.48</b>	<b>&lt;0.01</b>

**Table 1 :** Total concentrations, free ion activities and speciation data for the HEDTA + NTA and EDTA nutrient solutions used in the first experiment. All data were calculated using GEOCHEM-PC<sup>58</sup> using a fixed pH of 6.0. Charge balance calculations for the HEDTA + NTA and EDTA nutrient solutions give values of 2.8 % and 3.8 % respectively, indicating the model fits the concentration data reasonably well.

<i>+Fe Nutrient Solution</i>			<i>Proportion of each metal species in solution (%).</i>					
<b>Metal</b>	<b>Conc. (M)</b>	<b>Free ion activity</b>	<b>Free metal</b>	<b>SO<sub>4</sub></b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>EDTA</b>	<b>OH<sup>-</sup></b>	<b>CO<sub>3</sub></b>
Ca <sup>2+</sup>	2.00E-03	1.95E-03	97.50	0.71	1.22	0.01	<0.01	0.55
Mg <sup>2+</sup>	1.00E-03	9.90E-04	99.00	0.61	<0.01	<0.01	0.02	0.40
K <sup>+</sup>	2.00E-03	1.99E-03	99.50	0.04	0.31	<0.01	<0.01	<0.01
Na <sup>+</sup>	1.00E-04	9.98E-05	99.80	0.03	0.14	<0.01	<0.01	0.02
Fe <sup>3+</sup>	1.00E-04	7.78E-16	<0.01	<0.01	<0.01	96.11	3.14	<0.01
Mn <sup>2+</sup>	2.00E-06	1.71E-06	85.50	0.52	0.55	8.60	0.11	4.59
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>1.30E-06</b>	<b>1.66E-10</b>	<b>0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>99.80</b>	<b>0.11</b>	<b>0.07</b>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>1.60E-06</b>	<b>6.05E-08</b>	<b>3.78</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>95.63</b>	<b>0.35</b>	<b>0.24</b>
<i>-Fe Nutrient Solution</i>			<i>Proportion of each metal species in solution (%).</i>					
<b>Metal</b>	<b>Conc. (M)</b>	<b>Free ion activity</b>	<b>Free metal</b>	<b>SO<sub>4</sub></b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>EDTA</b>	<b>OH<sup>-</sup></b>	<b>CO<sub>3</sub></b>
Ca <sup>2+</sup>	2.00E-03	1.95E-03	97.50	0.76	1.22	<0.01	<0.01	0.55
Mg <sup>2+</sup>	1.00E-03	9.90E-04	99.00	0.61	<0.01	<0.01	0.02	0.40
K <sup>+</sup>	2.00E-03	1.99E-03	99.50	0.04	0.31	<0.01	<0.01	<0.01
Na <sup>+</sup>	1.00E-04	9.98E-05	99.80	0.03	0.14	<0.01	<0.01	0.02
Fe <sup>3+</sup>	2.00E-06	1.84E-16	<0.01	<0.01	<0.01	62.86	37.13	<0.01
Mn <sup>2+</sup>	2.00E-06	1.86E-06	93.00	0.56	0.59	0.52	0.12	5.00
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>4.00E-07</b>	<b>8.90E-10</b>	<b>0.22</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>96.76</b>	<b>1.89</b>	<b>1.19</b>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>6.20E-07</b>	<b>2.40E-07</b>	<b>38.71</b>	<b>0.29</b>	<b>0.38</b>	<b>54.52</b>	<b>3.55</b>	<b>2.49</b>

**Table 2 :** Total concentrations, free ion activities and speciation data for the +Fe and -Fe nutrient solutions used in the second experiment. All data were calculated using Flury<sup>25</sup> using a fixed pH of ....

Aqueous species	+Fe		-Fe	
	% solution	% flux	% solution	% flux
$\text{Zn}^{2+}$	3.78	86.30	38.71	86.30
$\text{ZnCO}_3$	0.20	4.65	2.10	4.64
$\text{ZnOH}^+$	0.20	4.21	1.98	4.23
$\text{Zn(OH)}_2$	0.15	3.35	1.56	3.33
$\text{ZnNO}_3^+$	0.04	0.85	0.38	0.85
$\text{ZnSO}_4$	0.03	0.64	0.29	0.64
$\text{Zn-EDTA}^{2-}$	95.63	<0.01	54.52	<0.01
$\text{ZnHCO}_3^+$	0.04	<0.01	0.40	<0.01
$\text{Cu(OH)}_2$	0.09	48.38	1.59	48.39
$\text{CuCO}_3$	0.07	35.86	1.18	35.82
$\text{CuOH}^+$	0.02	8.51	0.28	8.54
$\text{Cu}^{2+}$	0.01	6.95	0.22	6.95
$\text{Cu(CO}_3)_2^{2-}$	<0.01	0.17	0.01	0.17
$\text{CuNO}_3^+$	<0.01	0.09	<0.01	0.09
$\text{CuSO}_4$	<0.01	0.04	<0.01	0.04
$\text{Cu-EDTA}^{2-}$	99.80	<0.01	96.76	<0.01

**Table 3:** Main species in solution and taken up by plants as determined by the Fluxy code<sup>25</sup> (in %). For all calculations, we considered the geometry of the roots to be spherical because of similar radius and thickness of the diffusion layer of 150 $\mu\text{m}$ , and the site concentration is of 1.26 mmol.cm<sup>-2</sup>. The complexation constant  $K_a$  and the internalization speed  $K_{int}$  were fitted in order to obtain a flux matching with the concentration of metals in the plants at the end of the experiment. To compare the fitted flux (mol.cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) and the measured concentration (mol.g<sup>-1</sup>), it was necessary to account for the surface area of the roots. The specific mass surface of roots was estimated to amount to 303 cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> for wheat according to Bravin et al.<sup>59</sup> and 774 cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> for tomato (Smolders, personal communication), which, combined with the measured root biomass, enabled us to compute the root surface area.

The rate of internalization  $K_{int}$  ( $s^{-1}$ ) is supposed to depend on the plant, the studied metal and its concentration in the root apoplasm. This value was thus modified for each experimental condition. The fitted complexation constant  $K_a$  ( $l/mol.L^{-1}$ ) is different for Cu and Zn with a value of  $1.2 \times 10^{-7}$  for Zn and  $1.2 \times 10^{10}$  for Cu for both plants, indicating different uptake pathways for the two metals.





# Chapitre V

## Cu in contaminated soils: bioavailability, speciation and isotopic fractionation





# Détermination du fractionnement isotopique, de la spéciation et de la biodisponibilité du Cu en sols contaminés

## Résumé

Une contamination importante des sols agricoles, et en particulier des sols viticoles, en cuivre vient de l'application régulière de bouillie bordelaise ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) pour lutter contre le mildiou, une maladie parasitaire des plantes ; ce qui amène à un enrichissement massif en cuivre des horizons superficiels du sol. Dans le cadre de projets PNETOX et ECCO<sup>1</sup>, six sols anciennement viticoles reconvertis à la culture du blé et contaminés en cuivre ont été étudiés. La spéciation du cuivre dans ces sols a été déterminée par des prélèvements rhizon (sur sols nus et cultivés), des expériences de colonnes de sol sur le dispositif de la Donnan-Membrane<sup>2</sup> (SC-DM) et des calculs de modélisation. La modélisation est réalisée en ajustant la réactivité de la matière organique du sol (MOS) et de la solution (MOD). Sous serre, des plants de blé ont été cultivés afin de déterminer la biodisponibilité du cuivre. Le fractionnement isotopique du cuivre lors du prélèvement par le blé a été mesuré pour trois sols sur les six.

Les sols présentent une gamme de concentration en cuivre restreinte (de 100 à 157 mg.kg<sup>-1</sup>) mais des pH variables (de 4.23 à 7.48). Le cuivre extractible par l'EDTA représente entre 38 et 46 % du cuivre total. Les concentrations en cuivre des solutions mesurées par rhizon et par la SC-DM sont en bon accord, le cuivre en solution ne représentant pas plus de 0.7 % du cuivre total du sol. Dans le sol et dans la solution du sol, la spéciation du cuivre est majoritairement contrôlée par la matière organique.

La concentration en cuivre du blé, racines et parties aériennes confondues, ne peuvent être corrélées aux teneurs en cuivre total ou en cuivre extractible à l'EDTA des sols, ce qui est sûrement dû à la gamme restreinte des concentrations en cuivre des sols étudiés. En revanche, la concentration en cuivre du blé est corrélée positivement avec le pH et négativement avec

les concentrations en  $\text{Cu}^{2+}$  dans les solutions du sol. Cette relation peut être due à la baisse de la compétition entre les protons et les ions  $\text{Cu}^{2+}$ , ou à l'exudation de complexants spécifiques du fer, les phytosidérophores, aux pH élevés.

Les sols présentent des signatures isotopiques entre -0.06 et -0.14 ‰ ( $\delta^{65}\text{Cu}$ ), proches du standard NIST SRM 976 et de la majorité des roches terrestres. Les racines du blé cultivé sur deux sols acides (pH 5.38 et 5.44) sont enrichies en isotope lourd ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Racines-Sol}}$  de  $0.24 \pm 0.20$  ‰) alors que les parties aériennes sont enrichies en isotopes légers par rapport aux racines ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{PartiesAériennes-Racines}}$  de  $-0.40 \pm 0.25$  ‰). Le fractionnement isotopique mesuré pour le blé sur le sol calcaire ne diffère de celui sur sols acides que pour les racines, avec un faible enrichissement en isotope léger ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Racines-Sol}}$  de  $-0.07 \pm 0.12$  ‰). Une explication proposée serait une différence de spéciation du cuivre dans les différents sols. Pour les sols acides, le cuivre est principalement complexé aux sites de basse affinité de la MOS alors que pour le sol calcaire, le cuivre est complexé aux sites de haute affinité de la MOS et également adsorbé sur des oxydes de fer, ces deux processus étant susceptibles d'enrichir significativement la solution du sol en isotopes légers<sup>3, 4</sup>.

## Cu in contaminated soils: bioavailability, speciation and isotopic fractionation

D. Jouvin<sup>1,2</sup>, P. Louvat<sup>2</sup>, L. Denaix<sup>3</sup>, Y. Soulacroix<sup>3</sup>, A. Schneider<sup>3</sup>, M. N. Bravin<sup>4</sup>, P. Hinsinger<sup>4</sup> and M. F. Benedetti<sup>1</sup>

(1) Équipe de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot & Institut de Physique du Globe de Paris, Paris, France

(2) Équipe de Géochimie et Cosmochimie, Université Paris Diderot & Institut de Physique du Globe de Paris, Paris, France

(3) UMR Transfert sol plante Cycle des Eléments Minéraux dans les écosystèmes cultivés, Institut National de Recherche Agronomique, Bordeaux, France

(4) UMR Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère, Institut National de Recherche Agronomique, Montpellier, France

## **Abstract**

This work investigated the Cu speciation, bioavailability and isotopic fractionation during wheat uptake, for Cu-contaminated former vineyard soils. Cu speciation was determined through Soil Column Donnan Membrane experiences (SC-DM), rhizon sampling (on bare and planted soils) and modelling via the ECOSAT code. Wheat plants were cultivated on the soils in order to determine the bioavailability of Cu. Cu isotopic compositions associated with plant uptake were measured for three soils over six. Speciation in soils and soil solutions were calculated by adjusting soil organic matter (SOM) and dissolved organic matter (DOM) reactivity.

Soils present a restricted range of total Cu content ( $100 - 157 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) and varying pH (4.23 – 7.48). EDTA-extractable Cu in the soil accounts for 37.9 to 45.8 % of total Cu. Total Cu concentrations measured in the soil solutions extracted by rhizon sampling and SC-DM experiments are in good agreement with correlation coefficients of 0.93 for non-planted soils and of 0.73 for planted soils.  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations in the soil solution of SC-DM experiments decrease with pH. In the soil and in the soil solution, Cu is mainly complexed to SOM. Cu concentration in wheat plants (roots and shoots) could not be related to total Cu and EDTA-extractable Cu concentrations in soils. However, a significant relationship was observed between Cu in wheat plants and pH, in the soil and in the soil solution. This is followed by a negative correlation with  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in the soil solution determined by SC-DM experiments. This effect might be due to the exudation at high pH of Fe-complexing organic acids, called phytosiderophores or to less competition between  $\text{Cu}^{2+}$  and protons.

Cu isotopic compositions measured in soils are close to NIST SRM976 standard with a  $\delta^{65}\text{Cu}$  from -0.06 to -0.14 ‰. Roots of wheat plants grown on the two acidic soils (pH 5.38 and 5.44) are enriched in Cu heavy isotope compared to the soil and shoots are depleted in Cu heavy isotope compared to the roots. The third more basic soil exhibits a different fractionation for Cu uptake in the roots with a slight depletion of heavy isotope compared to the soil. This difference may be related to difference in soil speciation, with Cu bound mainly to SOM low-affinity sites for the acidic soils and mainly complexed to SOM high-affinity sites and Fe oxides in the most basic soil, these two processes susceptible to induce significant enrichment of lighter isotopes in the soil solution.

## 1. Introduction

Since the 19th century, Cu has been widely used in the Bordeaux mixture to fight against mildew in vineyard soils. This massive application of Cu has led to an important contamination of Cu in vineyards. Vineyard soils often reach Cu concentrations higher than the European Union legislation ( $140 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) as can be seen in many studies: up to 632 ppm in Galicia, Spain<sup>5-7</sup>, 378 ppm in Champagne, France<sup>8</sup>, up to 1030 ppm in Languedoc<sup>1, 9</sup>. In spite of these elevated concentrations in soils, vines do not seem to be sensitive to Cu toxicity<sup>10</sup>. However, vineyards are prone to soil-erosion processes because of their location on steep slopes<sup>6, 7</sup> leading to the mobilization and transport of Cu-enriched particles. Moreover, at the present time, many vine producing areas are involved in a deep reorganization process with former vineyard soils dedicated to other crops for animal or human consumption<sup>1, 10, 11</sup>. In the Languedoc region (Southern France), more than a third of the vineyard has been replaced by other crops, mainly durum wheat<sup>7</sup>. These changes in land uses might lead to Cu toxicity for the crops. In this context, a better understanding of Cu mobility and bioavailability in these soils is necessary to better predict the eventual Cu phytotoxicity of the newly grown crops.

In soils, Cu is mainly complexed to soil organic matter (SOM)<sup>6, 8, 11</sup> through inner-sphere complexes<sup>12-14</sup>. Cu can also be adsorbed on clays and Fe-oxides, when present, or co-precipitated with carbonates<sup>15</sup>. The distribution of Cu among these different phases correspond to the solid phase speciation of Cu in the soil. In the soil solution, Cu can be distributed among free  $\text{Cu}^{2+}$ , inorganic complexes and dissolved organic matter (DOM). Similarly to the solid phase, the speciation in the soil solution is usually also strongly influenced by organic matter<sup>16, 17</sup>. Cu speciation in soil and in soil solution greatly influences its mobility and thus the amount of Cu bioavailable to plants. pH has also a great influence on Cu adsorption: at higher pH, Cu complexation onto organic matter increases<sup>18</sup> and free  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in the soil solution is very low<sup>16</sup>. Commonly used models for plant uptake like the Free Ion Activity Model (FIAM) and the Biotic Ligand Model (BLM) consider free  $\text{Cu}^{2+}$  ions to be the main contributors in the Cu flux to the plants. In this case, low pH is associated with risks of Cu toxicity and high pH with Cu deficiency. This assumption has been reconsidered in some cases. First, these two models have been reconsidered recently<sup>19</sup> as

aqueous metal complexes can also contribute to the metal flux. Second, in calcareous soils, plants produce Fe chelating compounds<sup>20</sup> that are able to complex other metals like Cu<sup>21</sup> and Zn<sup>22</sup>. Finally, Thakali et al.<sup>23</sup> demonstrated recently that protons act as competitors for metals for receptor sites on the roots. At high pH, protons do not exert their competition anymore and this affects Cu toxicity. The influence of pH on the metal uptake strategy of plants and on Cu speciation in the soils has to be studied to ultimately understand Cu bioavailability.

In environmental geochemistry, isotopic measurements of metals have recently been demonstrated to be of great interest for tracing contamination<sup>24-27</sup> or for studying biogeochemical processes<sup>3, 4, 28-30</sup>. For Cu, to our knowledge, no study have been conducted on soils and on plants grown on soils. The first study by Jouvin et al.<sup>31</sup> (Chapter 4) demonstrated a significant fractionation of Cu isotopes during Cu uptake by tomato and wheat plants in hydroponic conditions. The isotopic composition of soils and plants grown in conditions close to the field (greenhouse) would then be of great interest to improve our knowledge of the Cu isotopic fractionation during plant uptake.

In this study, we focused on both Cu speciation in vineyard soils and bioavailability of Cu for plants. As part of a larger study, soils, coming from Languedoc region, southern France, were selected for similar Cu concentrations in order to highlight the effect of other parameters like the pH. Cu speciation in the soil and the soil solution was determined from soil characteristics, rhizon sampling, soil column donnan membrane experiments (SC-DM), and with the help of the ECOSAT code. Durum wheat plants were chosen for greenhouse growth experiments on these soils, as it is a common cultivated crop in the former vineyard soils of the Languedoc region. Finally, isotopic measurements were realized in soils and wheat plants.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Soils sampling and analysis**

Six samples of Cu-contaminated, former vineyard soils were collected between March and May 2006 in a thirty kilometers area around Béziers, south of France. Sampling was realized



with a spade on the surface horizon (depth of 20 cm). Bulk soil samples were air-dried and sieved at 2 mm prior to use. Bulk soil samples were sent for routine analysis to INRA Arras Laboratory (France) according to French procedures (AFNOR 1999) and international procedures (ISO 1999) for: pH, total and EDTA-extractible Cu, total and EDTA-extractible Fe, total Zn, Fe and Mn oxides, grading, carbonates, organic carbon and organic nitrogen. Analysis procedures realized on these soils are detailed in the web page [http://www.arras.inra.fr/pages/methode\\_du\\_las\\_sols.htm](http://www.arras.inra.fr/pages/methode_du_las_sols.htm).

## 2.2. Plant growth

Durum wheat (*Triticum turgidum durum* L., cv Acalou) seeds were surface sterilized with 0.5 % NaOCl for 20 minutes and rinsed with distilled water. The seeds were germinated for two days in paper wetted with 0.6 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> and 2 μmol.L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Then the seedlings were pricked out to pots containing the equivalent of 2 kg of dry matter of field moist soil (5 to 10 % of humidity) sieved at 4 mm. The plants were cultivated during 29 days in a greenhouse in INRA, Bordeaux. For each of the 6 soils, 7 pots were used with 2 controls (without plants) and 5 with 3 seedlings in each (previously grown for 2 days). Each pot received a nitrogen fertilization at the beginning of experiment (40 mg of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.kg<sup>-1</sup>) corresponding to an amount of 50 kg N.ha<sup>-1</sup>. Pots were watered every day (80 % of pot capacity corresponding to approximately 400 g of water) and weighted in order to estimate the evapotranspiration. The transpiration of the plants was determined by the difference between the evapotranspiration of the planted pots and the evaporation of the control pots.

At harvest, roots and shoots were separated from each other and briefly rinsed with milliQ water to eliminate the residual soil. The samples were weighted, dried in an oven for 48 hours (80°C). The dried samples were digested in a microwave oven with concentrated HNO<sub>3</sub> (7 minutes at 85°C, 2 MPa and 20 minutes at 180°C, 5.52 MPa) along with blanks and *Zea mays* L., V463 reference material (4.72 ± 0.54 μg.g<sup>-1</sup> of Cu). Concentrations of Cu in the plant digests were determined by an atomic absorption spectrophotometer (GF-AAS) GF 95 from Thermo Scientific. Blanks of the digestion process were typically around 1 ng.g<sup>-1</sup> of Cu for

minimum mineralized plant concentrations of 48 ng.g<sup>-1</sup> of Cu. The mineralized maize standards had Cu concentrations within uncertainties for the certified concentrations.

### 2.3. Isotopic measurements

Isotopic measurements were realized on HNO<sub>3</sub> digested plant samples and on soils previously mineralized. Mineralizations of soils were realized through concentrated acid attacks with a mixture of 0.2 mL 27 mol.L<sup>-1</sup> HF of 0.6 mL of 16 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> overnight on a hot plate. After evaporation, samples were dissolved in 1 mL HNO<sub>3</sub> and re-evaporated to finally be dissolved in 1 mL HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>. Previous to isotopic measurements, Cu in the samples was separated from other elements following the protocol of Maréchal et al.<sup>32</sup>. Columns from Biorad (8 mm Ø and 4 cm long) were filled with 1.6 mL of AG MP 1M resin. The yields were carefully checked for each sample with an atomic absorption spectrometer (SAAF) Solaar Unicam or a XII series Quad ICP-MS from Thermo Fischer Scientific (depending on the sample concentration). Cu and Zn blanks were also determined and were below 10 ng for the entire procedure.

Cu isotopic compositions were determined using a MC-ICP-MS (Neptune, ThermoFinnigan) with an APEX introduction system. The mass discrimination correction used is described elsewhere<sup>4</sup> (i.e. Zn internal standard for exponential mass discrimination law and “loose” standard bracketing with a standard each two samples). Samples were introduced with Zn standard as internal standard, with Zn/Cu ratio of 2. Typical concentrations of the measured sample solutions were of 200 ng.g<sup>-1</sup> and 100 ng.g<sup>-1</sup> for Zn and Cu, respectively in HNO<sub>3</sub> 0.05 mol.L<sup>-1</sup> giving intensities around 8V for <sup>63</sup>Cu and <sup>64</sup>Zn (10<sup>11</sup> W resistances for the faraday cup amplifiers). Blanks during a measurement session were usually below 1 mV. All our data are expressed relative to the NIST 976 standard<sup>33</sup> following the delta notation:

$$\delta^{65}\text{Cu} = \left( \frac{\left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{sample}}}{\left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

For better comparison with other studies, results can also be expressed as D with, for example,  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{A-B}} = \delta^{65}\text{Cu}_{\text{A}} - \delta^{65}\text{Cu}_{\text{B}}$ . The entire purification and measurement procedure was repeated six times on one of our plant sample and led to a  $\delta^{65}\text{Cu}$  external reproducibility of 0.12 ‰ (2 $\sigma$ ). This uncertainty was given to all samples where no external reproducibility can be estimated, i.e. when only one purification procedure and one measurement were realized (see Appendix 2). When considering average isotopic compositions of roots and shoots for a soil, uncertainties correspond to the 2 STD uncertainties measured on repetition of the entire experiment, from plant growing to measurement on the MC-ICP-MS, for five pots (only four repetitions for the roots of MUR2B soil).

## 2.4. Speciation in the soil solution

### 2.4.1. Rhizon

Soil solutions were extracted by rhizon samplers during the plant growth experiments. The rhizon samplers were installed at half the height of the pots and 10 mL of the soil solution was extracted weekly. pH was determined on each sample along with Cu concentrations (with a GF-AAS) and organic C (with a TOC analyzer). Organic C is assumed to represent 50 % of dissolved OM (DOM) and allows us to recalculate DOM content of the soil solution.

### 2.4.2. Soil Column Donnan Membrane

The Soil Column Donnan Membrane<sup>2</sup> (SC-DM) is an adaptation of the Donnan Membrane device<sup>34</sup> and consists of a cation exchange membrane separating a donor and an acceptor solution. It was used in the present study to experimentally simulate soil solutions in equilibrium with the studied soils and to measure their speciation (only free cations can pass through the membrane). The membrane is negatively charged and only cations can cross the membrane. Equilibration is attained when the acceptor and donor sides have equal cation concentration. The stock of metals in the soil in the donor side is large enough to ensure that

the chemical equilibrium in the donor side is not disturbed by the metal loss towards the acceptor side.

During experiment, the donor side contained the studied soil in an electrolyte solution (i.e.  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mmol.L<sup>-1</sup>), simulating the ionic strength of typical soil solution. The equilibrium between both sides was reached in less than 3 days, as shown by Weng et al.<sup>35</sup>. Previous to experiments, the different parts of the system were intensively washed<sup>4</sup>. The soil/solution ratio was of 200 g.L<sup>-1</sup>, corresponding to 8 g of soil in 40 mL of the electrolyte solution in the donor side. The volume of the acceptor solution was of 20 mL.

Cu concentrations in the donor and acceptor sides were determined by a XII Series ICP-MS (Thermo Scientific). Organic C was measured via a TOC analyzer in both sides of the SC-DM. The difference of organic C content, between the donor and acceptor sides, was considered to be the organic C in equilibrium with the soil, i.e. the organic C of the DOM. As for rhizon samples, organic C concentration was multiplied by 2 to obtain DOM concentration. Ca concentration was also measured in the acceptor and donor sides to correct for salt effects on the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration: due to ionic strength (mainly  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  in our study), the concentration of free  $\text{Cu}^{2+}$  in the donor side had to be recalculated from  $\text{Cu}^{2+}$  in the acceptor side following the equation<sup>34</sup> :

$$\left[ \frac{\text{Cu}_{\text{Donor}}^{2+}}{\text{Cu}_{\text{Acceptor}}^{2+}} \right]^{1/2} = \left[ \frac{\text{Ca}_{\text{Donor}}^{2+}}{\text{Ca}_{\text{Acceptor}}^{2+}} \right]^{1/2} \quad (2)$$

## 2.5. Modeling

Modeling of the speciation in the soil and the soil solution was realized with the help of the ECOSAT code. It contains the NICA-Donnan model with generic parameters to describe the metal binding to organic matter<sup>36, 37</sup>, the generic CD-MUSIC model parameters for the interaction of Cu with Fe-oxides<sup>38</sup>, those of the DDL model with Mn-oxides<sup>39</sup>, a donnan approach for metal binding with clays<sup>40</sup> and thermodynamic parameters for inorganic metal ion complexation<sup>41</sup>.

Knowing the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration with the help of SC-DM measurements, the reactivity of SOM and DOM was adjusted to obtain a total Cu concentration in soil equivalent of the measured EDTA-extractable Cu and a total Cu concentration in the soil solution comparable with the Cu concentration measured in the donor side of the SC-DM.

The SOM and DOM were modeled as humic acid<sup>40</sup> (HA) and fulvic acid<sup>17, 42, 43</sup> (FA), respectively. NICA-Donnan model considers two types of sites for complexation: the low-affinity sites (LAS) corresponding mainly to carboxylic type of sites and the high-affinity sites (HAS) corresponding mainly to phenolic type of sites.

### 3. Results

#### 3.1. Soils

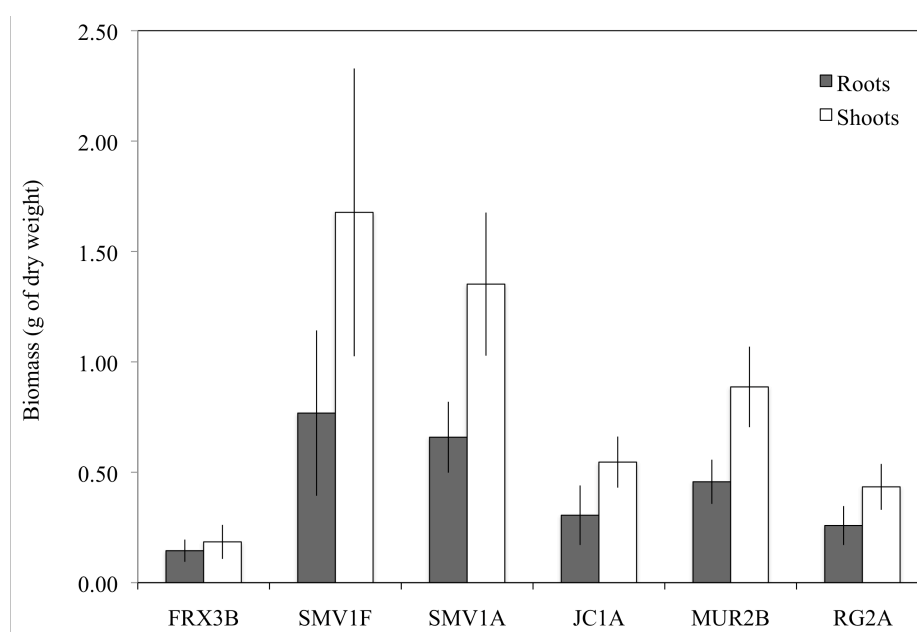
Selected geochemical properties of the six studied soils are presented in Table 2. Total Cu concentrations in the soils were close, with values ranging from 100 to 157  $\text{mg.kg}^{-1}$ . The pH of the soils varied from 4.23 to 7.48. Extraction by EDTA led to Cu concentrations from 39.0 to 65.7  $\text{mg.kg}^{-1}$ , representing 38 to 46 % of total Cu in the soil. The two soils with the higher pH were calcareous soils and contained carbonates.

Soil	pH CaCl <sub>2</sub>	Cu		Fe	Fe-oxide	Clays g	CaCO <sub>3</sub> g.kg <sup>-1</sup>	Corg g.kg <sup>-1</sup>
		Total HF mg.kg <sup>-1</sup>	EDTA mg.kg <sup>-1</sup>	Total HF %	Tamm g.kg <sup>-1</sup>			
FRX3B	4.23	106	43.5	3.59	0.2	488	0	12.2
SMV1F	5.38	100	42.9	2.5	0.07	270	0	15.4
SMV1A	5.44	157	65.7	3.41	0.14	355	0	17.1
JC1A	6.26	141	64.6	2.53	0.09	281	0	9.8
MUR2B	6.20	120	54	2.32	0.05	260	2	9.0
RG2A	7.48	103	39	2.85	0.05	336	4	6.1

**Table 2:** Selected chemical and physical properties of the studied soils (ARRAS laboratory analyses)

### 3.2. Plants

Biomass of the roots and shoots of the wheat grown in the six different soils are presented in Figure 40 and Table 3. Except for the first soil (the acidic FRX3B), both roots and shoots biomass of plants globally decreased with pH. The FRX3B exception was due to Al toxicity. Al concentration in this soil was 40 times higher than those in the other soils (results not shown here). Roots of plants grown on FRX3B were short, stocky and more lignified than roots of plants grown on other soils, which is typical of Al phytotoxicity<sup>44, 45</sup>.



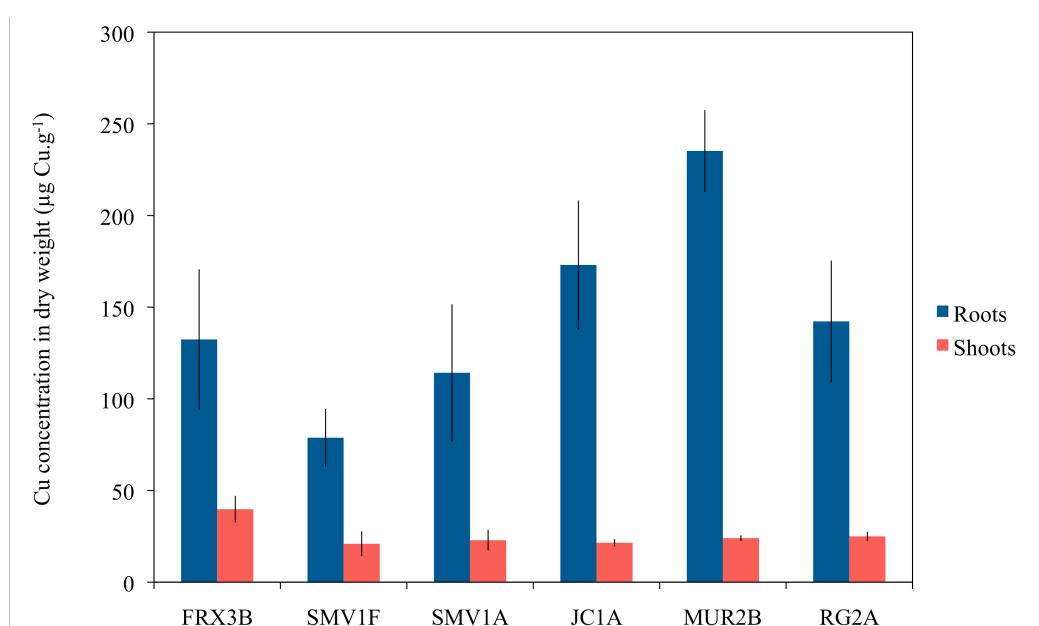
**Figure 40:** Average dry matter biomass of the roots and shoots of wheat plants grown on the six soils

	Dry Matter				Cu concentration			
	Roots		Shoots		roots		Shoots	
	g	1σ	g	1σ	μg Cu.g <sup>-1</sup>	1σ	μg Cu.g <sup>-1</sup>	1σ
FRX3B	0.1	0.1	0.2	0.1	132.4	38.3	39.8	7.3
SMV1F	0.8	0.4	1.7	0.7	78.8	15.7	20.9	6.8
SMV1A	0.7	0.2	1.4	0.3	114.2	37.4	22.9	5.6
JC1A	0.3	0.1	0.5	0.1	173.0	35.2	21.5	2.0
MUR2B	0.5	0.1	0.9	0.2	235.2	22.3	24.0	1.5
RG2A	0.3	0.1	0.4	0.1	142.2	33.2	25.0	2.5

**Table 3:** Biomass and Cu concentration of wheat plants (average from five pots for each soils)

Cu concentration in the roots of wheat plants varied from 79 to 235  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (dry weight) for the six soils (Figure 41 and Table 3). Despite these varying concentrations in the roots, Cu in the shoot was fairly constant ( $22.86 \pm 1.70 \mu\text{g.g}^{-1}$  of dry weight), apart from the acidic soil FRX3B, which presented nearly double Cu concentration ( $40 \mu\text{g.g}^{-1}$ ).

Cu concentrations in roots did not correlate with main soil properties such as  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$ , total Cu or Cu-EDTA concentrations. A correlation trend for Cu concentration in roots was observed with  $C_{\text{org}}$  ( $R^2 = 0.40$ ). Correlation was observed for Cu concentration in shoots with  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$  ( $R^2 = 0.57$ ).



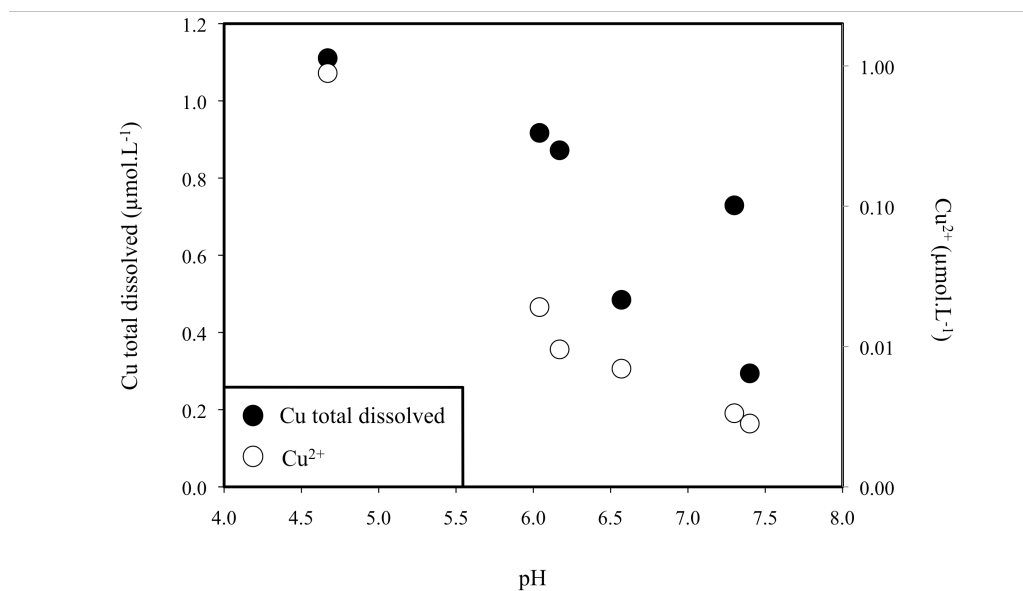
**Figure 41:** Average Cu concentration in the different parts of the plants (roots and shoots) grown on the six studied soils

### 3.4. Rhizon and SC-DM

#### 3.4.1. Soil-Column DM

Results of the SC-DM experiments are given in Table 4. The donor side represented the soil solution containing a mixture of free  $\text{Cu}^{2+}$ , inorganic (other than  $\text{Cu}^{2+}$ ) and organic Cu complexes while the acceptor side only contained free  $\text{Cu}^{2+}$ .  $\text{Cu}^{2+}$  in the donor side was

recalculated from Equation (1). Both total dissolved Cu and  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations in equilibrium with the soil decreased with increasing pH (Figure 42).



**Figure 42:** Cu in the donor soil solution measured with the SC-DM: total Cu and calculated  $\text{Cu}^{2+}$

SC-DM	Donor side = soil solution					Acceptor side = $\text{Cu}^{2+}$	
	pH $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Cu $\mu\text{mol.L}^{-1}$	$\text{Cu}^{2+}$ $\text{nmol.L}^{-1}$	Ca $\text{mmol.L}^{-1}$	DOM $\text{mg.L}^{-1}$	Cu $\text{nmol.L}^{-1}$	Ca $\text{mmol.L}^{-1}$
FRX3B	4.7	1.1	889.2	1.82	24.61	885.54	1.82
SMV1F	6.0	0.9	19.1	2.08	67.30	18.26	1.98
SMV1A	6.2	0.9	9.5	1.47	87.78	2.50	1.84
JC1A	6.6	0.5	7.0	1.55	56.06	8.86	1.98
MUR2B	7.3	0.7	3.3	2.50	102.41	2.79	2.08
RG2A	7.4	0.3	2.8	2.38	20.31	11.93	2.11

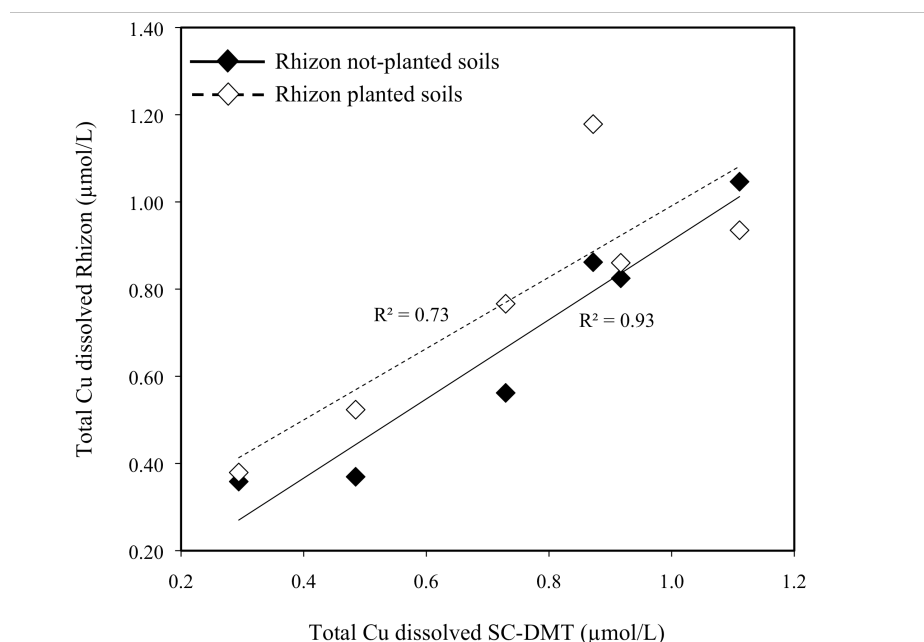
Rhizon	Non-cultivated soils			Cultivated soils		
	pH water	Cu $\mu\text{mol.L}^{-1}$	DOM $\text{mg.L}^{-1}$	pH water	Cu $\mu\text{mol.L}^{-1}$	DOM $\text{mg.L}^{-1}$
FRX3B	4.67	1.05	221.0	4.67	0.94	227.5
SMV1F	5.22	0.82	240.2	5.18	0.86	264.1
SMV1A	5.26	0.86	222.8	5.49	1.18	248.7
JC1A	6.06	0.37	238.6	6.17	0.52	237.2
MUR2B	7.49	0.56	242.6	7.52	0.77	261.0
RG2A	7.60	0.36	219.5	7.73	0.38	225.0

**Table 4:** Measurements with the SC-DM and the Rhizon sampling



### 3.4.2. Rhizon sampling

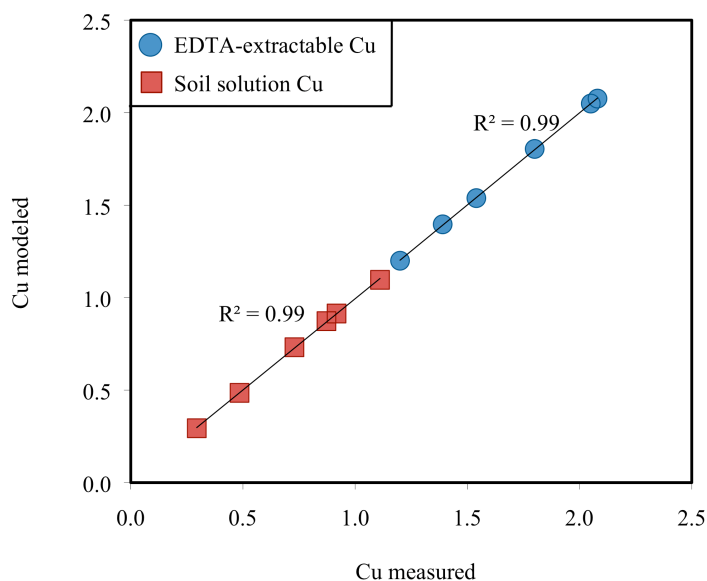
Measurements of Cu, DOM concentrations as well as pH were realized on the rhizon samples for planted and non-planted soils (Table 4). The Cu concentrations in the rhizon samples were similar to those measured in the donor side of the SC-DM experiments (Figure 43) for both planted and not-planted soils. The correlation was however better for not-planted soils ( $R^2 = 0.93$ ) than for planted soils ( $R^2 = 0.73$ ). In cultivated soils, five over six soils displayed higher pH and higher Cu and DOM concentrations compared to the bare pots.



**Figure 43:** Comparison between Cu concentrations in the rhizon samples and SC-DMT measurements

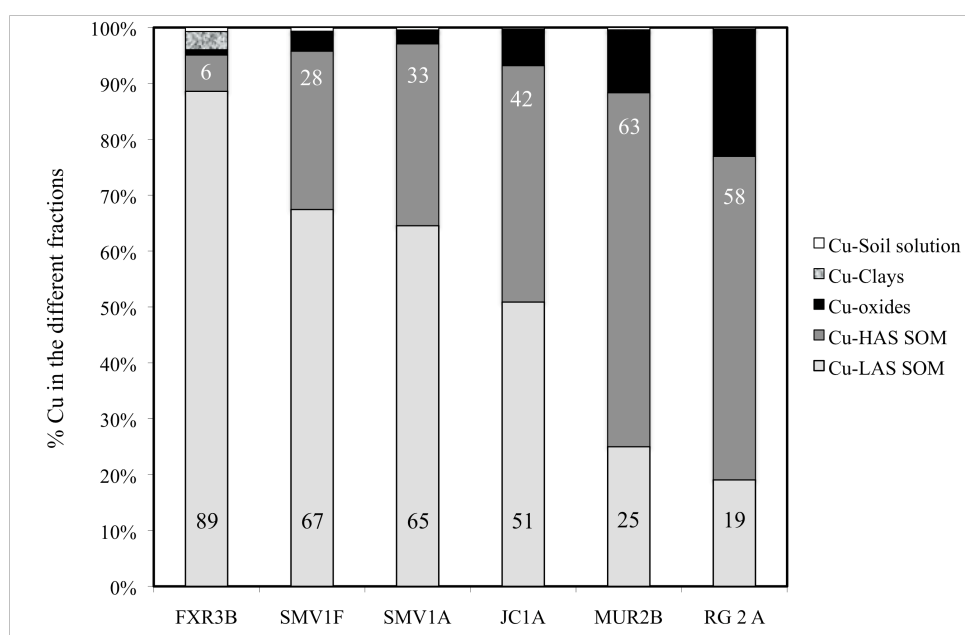
### 3.5. Modeling soils and soil solutions

Modeling the EDTA-extractable Cu content of the soil from  $\text{Cu}^{2+}$  in the donor solution of SC-DM experiments by adjusting SOM reactivity was realized satisfactorily for all soils (Figure 44). Reactivity of SOM, considered as HA during calculations, varies between 22 and 46 % (Appendix 3).



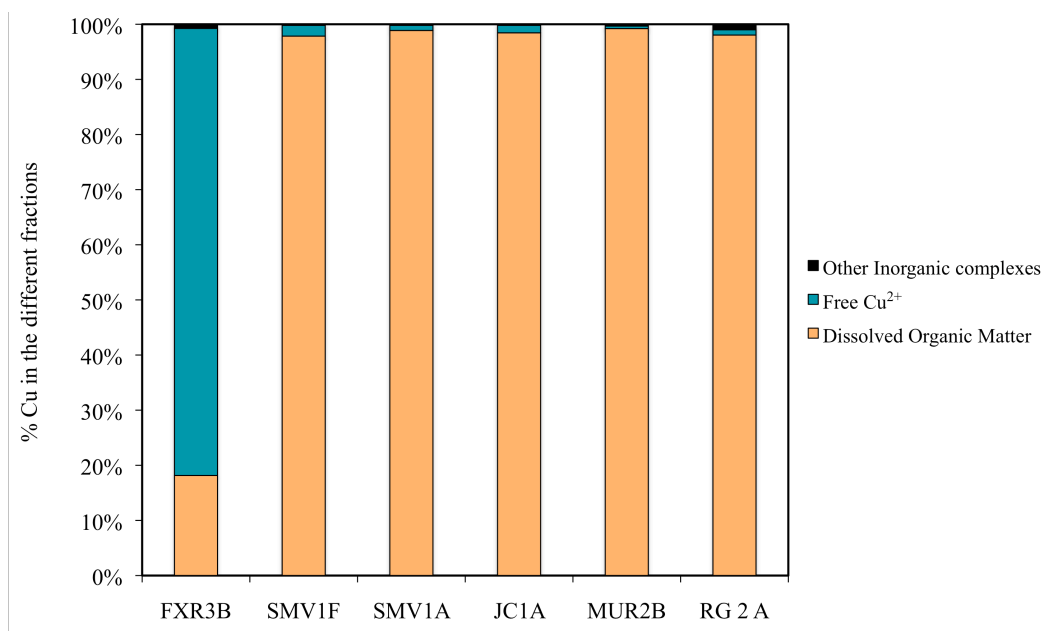
**Figure 44:** Comparison of measured and modeled (via the ECOSAT code): i) EDTA-extractable Cu content of the soils ( $\times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) and ii) Cu in the soil solution ( $\times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ )

The speciation in the soils can be found in Figure 45 and. 75 to 95 % of Cu in all soils was complexed to SOM. Among the Cu bound to SOM, the proportion of Cu complexed to HAS and LAS varied according to pH, with more HAS and less LAS complexation with increasing pH (Figure 45). For soils under pH 6.5, the proportion of other phases (oxides, clays and soil solution) were below 5 %, while, at higher pH, adsorption on Mn and Fe oxides became more important. For the most basic soil RG2A, Cu adsorbed on oxides represented around 23 % of total Cu.



**Figure 45:** Cu speciation in the six soils, determined with the ECOSAT code

From  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations determined by SC-DM, modeling the soil solution was also realized by adjusting DOM reactivity and fitting the total Cu content in the solution. The fitted total Cu concentration in the donor side, i.e. in the soil solution, was in good agreement with the measured Cu concentration (Figure 44).

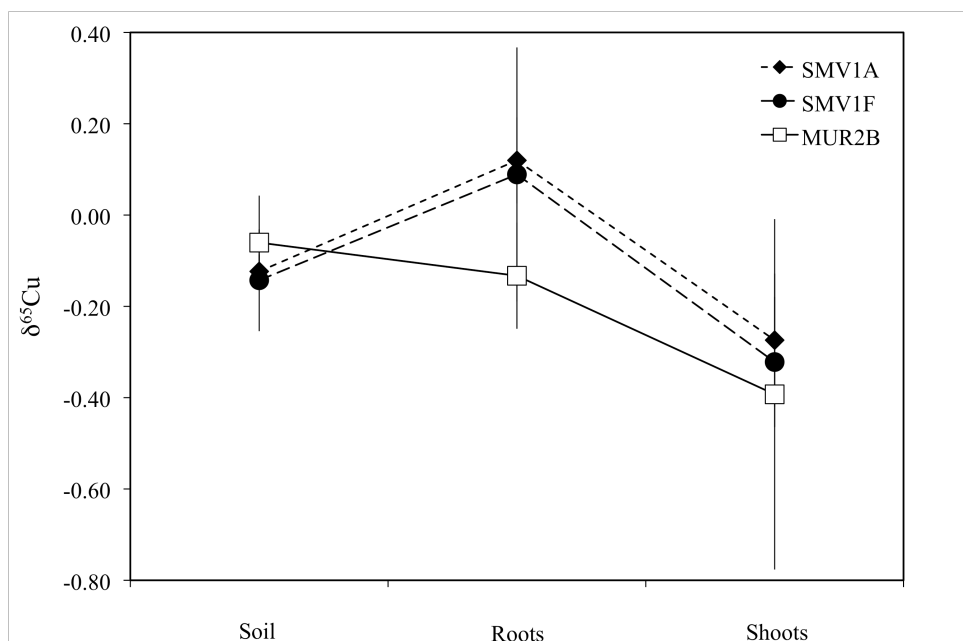


**Figure 46:** Cu speciation in the soil solutions, determined by calculation with the ECOSAT code

As can be seen in Figure 46 and in Appendix 3, except for the most acidic soil FRX3B, Cu speciation in the soil solution was completely controlled by dissolved organic matter; free  $\text{Cu}^{2+}$  and other inorganic complexes being negligible in five soils over six. Cu complexed to DOM was predominantly on LAS in all soils (Appendix 3). Only for the most acidic soil FRX3B, was the free  $\text{Cu}^{2+}$  the main specie of Cu in the solution: 81 % of  $\text{Cu}^{2+}$  versus 18 % of Cu-DOM.

### **3.6. Cu isotopic measurements**

Average Cu isotopic compositions of soils and plants are presented in Table 5, Figure 47 and Appendix 3. Soils had similar Cu isotopic signatures with  $\delta^{65}\text{Cu}$  values of  $-0.12 \pm 0.04$  ‰ for SMV1A,  $-0.14 \pm 0.11$  ‰ for SMV1F and  $-0.06 \pm 0.10$  ‰ for MUR2B. Plants cultivated in SMV1A and SMV1F soils (about  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$  5.4) presented similar behavior with an enrichment of the heavier isotope in the roots compared to the soil and of the lighter isotope from roots to shoots, while the Cu isotopic composition of plants in the MUR2B soil ( $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$  of 6.2) was characterized by a slight enrichment of the lighter isotope between soil and roots, as well as, between roots and shoots.



**Figure 47:** Average Cu isotopic compositions of three soils and of roots and shoots of wheat grown on these soils

The quantification of these isotopic fractionations is expressed as  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Roots-Soil}}$  and  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoots-Roots}}$ . The  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Roots-Soil}}$  of SMV1A and SMV1F were identical,  $0.24 \pm 0.09$  ‰ and  $0.23 \pm 0.28$  ‰ respectively, and differed from that of MUR2B,  $-0.07 \pm 0.12$  ‰. On the other hand, the  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoots-Roots}}$  were similar for plants cultivated on the three soils, with values of  $-0.39 \pm 0.19$  ‰,  $-0.41 \pm 0.32$  ‰ and  $-0.33 \pm 0.34$  ‰ for SMV1A, SMV1F and MUR2B respectively.

	SMV1F		SMV1A		MUR2B	
	$\delta^{65}\text{Cu}$	$2\sigma$	$\delta^{65}\text{Cu}$	$2\sigma$	$\delta^{65}\text{Cu}$	$2\sigma$
Soil	-0.14	0.11	-0.12	0.04	-0.06	0.10
Roots	0.09	0.28	0.12	0.09	-0.13	0.12
Shoots	-0.32	0.14	-0.27	0.15	-0.39	0.38
	$\Delta^{65}\text{Cu}$		$\Delta^{65}\text{Cu}$		$\Delta^{65}\text{Cu}$	
	$2\sigma$		$2\sigma$		$2\sigma$	
Roots-Soil	0.23	0.28	0.24	0.09	-0.07	0.12
Shoots-Roots	-0.41	0.32	-0.39	0.19	-0.33	0.34

**Table 5:** Average Cu isotopic compositions of three soils and wheat plants expressed in  $\delta$  and  $\Delta$  notations.

## **4. Discussion**

### **4.1. Plant uptake and bioavailability**

Wheat cultivated on the most acidic soil FRX3B presented Al toxicity affecting mainly the roots. This toxicity might have affected the physiology of plants and their ability to take up other nutrients. Indeed, Cu concentration in roots and shoots of wheat plants grown on this soil were different from the other plants. For roots and shoots, plants grown on FRX3B exhibited higher Cu concentration than the other acidic soils (SMV1A and SMV1F). In the following discussion, this soil will then be removed to the linear regressions.

In our study, we observed for the five other soils that Cu concentrations in the shoots were fairly constant. This control of Cu translocation has been observed in many studies<sup>1, 21, 46, 47</sup>. Linear regressions were performed between Cu concentrations in the roots and shoots and geochemical parameters measured in the soils (part 3.2.) and during speciation experiments.

Relationship between Cu uptake by plants (i.e. bioavailable Cu) and Cu content in the soil (total or EDTA-extracted) is still a matter of debate with contradictory studies. Brun et al.<sup>9</sup> and Michaud et al.<sup>1</sup> observed a significant correlation between Cu concentrations in the roots and total Cu concentrations in soils and an even better correlation with EDTA-extractable Cu concentrations during laboratory growth experiment with maize and in the field with wheat respectively. However, Brun et al.<sup>48</sup> collected species of wild plants growing in Cu contaminated soils. Four of these wild species were tested for correlation with the different forms of extractable Cu. Except for Cu from CaCl<sub>2</sub> extractions, where correlation was observed for all plants, half of the plants did not show any correlation for total Cu or Cu-EDTA of the soils. Cornu et al.<sup>49</sup> also were not able to relate Cu concentration in tomato plants and total Cu or EDTA-Cu of the soils. In our case, we did not observe any correlation of wheat Cu concentrations with total Cu contents or with EDTA-extractable Cu in soils. Total Cu in soils and Cu-EDTA did not vary a lot in our study. Our study focused on pH variation effects, so other soils with a wider range of Cu concentrations should have been selected to test this type of correlation.

No correlation have been observed between  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$  and Cu concentration in the roots, while a slight but significant correlation can be pointed out between Cu concentrations in roots and  $\text{pH}_{\text{Ca}(\text{NO}_3)_2}$  or  $\text{pH}_{\text{Rhizon}}$  during in rhizon and SC-DM samples (identical  $R^2$  of 0.52). The correlation was even better with Cu concentrations in shoots with a correlation coefficient of 0.75 for  $\text{pH}_{\text{Rhizon}}$  and of 0.77 for  $\text{pH}_{\text{Ca}(\text{NO}_3)_2}$ . This increasing Cu concentration in plants with the pH was consistent with previous studies<sup>1, 46</sup>. The difference between  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$  and  $\text{pH}_{\text{Rhizon}}$  or  $\text{pH}_{\text{Ca}(\text{NO}_3)_2}$  pH might be due to the fact that different time of equilibration are considered (20 minutes for  $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$ , three days for  $\text{pH}_{\text{Ca}(\text{NO}_3)_2}$  and a week for  $\text{pH}_{\text{Rhizon}}$ ).

pH influences the speciation of Cu and is probably related to Cu uptake. Chaignon et al.<sup>46</sup> found increasing Cu accumulation in plants with increasing rhizospheric pH in case of acidic soils but no relation in calcareous soils. Bravin et al.<sup>50</sup> interpreted the absence of Cu uptake variations with pH as an alkalization of the rhizosphere. In our study, only bulk pH was considered so, even if plants induced chemical changes in the rhizosphere, the bulk soil pH still seemed to influence plant uptake.

Cu concentrations in shoots and roots did not correlate with the total Cu content of the soil solution measured in the rhizon samples or in the SC-DM experiments. However, they negatively correlated with  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations from the SC-DM experiments:  $R^2$  of 0.60 for roots and of 0.66 for shoots. Even if surprising, this result was consistent with the previous pH correlation, because when pH increased,  $\text{Cu}^{2+}$  concentration decreased. It is usually assumed that phytotoxicity is maximal at low pH and high  $\text{Cu}^{2+}$  in the soil solution. This was observed for tomato and oilseed rape by Chaignon et al.<sup>46, 47</sup> and Cornu et al.<sup>49</sup>. However, Brun et al.<sup>9</sup> found that for maize, plants accumulate as much Cu in acidic soils than in calcareous soils and Michaud et al.<sup>21</sup>, for wheat, observed that soil pH is positively correlated to root Cu concentration. Maize and wheat are characterized by the production of Fe complexing agents, phytosiderophores, with increasing pH<sup>20</sup>. These phytosiderophore are also able to complex other metals and could be a reason for higher Cu concentration in plants at higher pH<sup>10</sup>. Unfortunately, no specific measurements of phytosiderophores have been realized in the soil solution of the rhizon samples of the planted soils. It is also probable that competition effects between protons and copper occurred at low pH and disappeared at higher pH<sup>23</sup>.

Concerning organic carbon, a slight correlation was observed between  $C_{org}$  in the soil and Cu concentration in the plants with  $R^2 = 0.40$  in roots and  $R^2 = 0.39$  in shoots. DOM in SC-DM experiments could not be correlated to Cu in plants either. In the rhizon samples, the higher DOM concentrations could be interpreted as DOM produced by plants to remove more nutrients from the soil solution. Neither the DOM in the cultivated or in the bare pots or the produced DOM (i.e. the difference between DOM of rhizon samples in cultivated and of bare pots) could be related to Cu in the plants. Nevertheless, plants were susceptible to produce many different organic acids, many of which are absolutely not related to metal uptake. In the future, specific measurement of phytosiderophores<sup>10</sup> or complexing organic acids should be realized in order to improve our understanding of Cu uptake by plants.

Relationships between Cu concentration in plants and soil speciation modeled in SC-DM experiment were also investigated. No relationship was observed between plant Cu concentration and Cu adsorbed on Fe oxides or total Cu complexed to SOM and DOM. However, Cu concentration in roots was negatively correlated to the amount of Cu adsorbed on clays ( $R^2 = 0.60$ ) and positively correlated to that on Mn oxides ( $R^2 = 0.87$ ).

Moreover, even if no correlation was observed between Cu in roots and Cu bound to SOM and DOM, a good correlation was observed with the proportion of Cu complexed to the HAS of SOM ( $R^2 = 0.97$ ) and DOM ( $R^2 = 0.68$ ). Cu concentration in roots was also correlated to the proportion of Cu bound to DOM, positively with  $R^2 = 0.51$  and to the proportion of  $Cu^{2+}$ , negatively with  $R^2 = 0.64$ . These relationships may well only reflect mass budget effects in the speciation, as HAS proportion increases with pH.

#### **4.2. Modeling and organic matter reactivity**

One important point in modeling metal complexation in soils and aquatic systems is the reactivity of organic matter. This is even critical for Cu due to its high affinity with organic matter. Assuming a generic reactivity for each environmental system or adjusting this parameter in each case could have a significant impact on modeling metal behavior.



#### 4.2.1. Organic matter reactivity

SOM contains other components than humic substances (HS), like plant residual and microorganisms biomass, which might have different affinity for complexing ions than HS<sup>40</sup>. It is then expected that all SOM will not have the same reactivity than HS. Weng et al.<sup>40</sup> calculated soil-solution partition of metals for sandy soils and estimated the site density of the SOM in their soils to be 16 to 46 % of the site density of generic HA. This estimation was equivalent to consider that part of the SOM was inert. In a following study, Weng et al.<sup>17</sup> considered the SOM to be 31 % reactive. Schröder et al.<sup>51</sup> and Cancès et al.<sup>2</sup> also considered SOM to be represented by HA but with a reactivity of 50 %. On a mineral soil, Tipping et al.<sup>52</sup> found that 10 % of SOM was present as active humic substances. The percentages of reactivity obtained in this study for SOM, assumed to be HA, between 22 and 46 %, are consistent with these previous studies.

In our study, in the dissolved phase, DOM reactivity varied from 36 to 80 %. Most studies in the literature<sup>42, 53-55</sup> assume DOM in the soil solution or in freshwaters to be around 50-65 % of FA, the rest being inert. However, it is not always sufficient to describe Cu behavior in aquatic systems, as in Guthrie et al.<sup>56</sup>'s study where predicted Cu<sup>2+</sup> concentrations are an order of magnitude lower than those measured in a lake. Weng et al.<sup>17</sup> proposed two assumptions for calculation of DOM: i) DOM was composed of 30 % FA, 30 % HA and 40 % was inert and ii) DOM was composed of 65 % FA and 35 % was inert. They confirmed the second assumption to be the more appropriate for Cu complexation with DOM. Nevertheless, in our study, as for SOM, we considered DOM reactivity to be variable, depending on each soil and on its chemical properties, and we obtained consistent results.

#### 4.2.2. Comparison of SC-DM and rhizon sampling

Total Cu concentrations were similar in soil solutions from both rhizon sampling and SC-DM. DOM concentrations were however clearly different with 60 mg.L<sup>-1</sup> on average for the SC-DM experiments and 230 mg.L<sup>-1</sup> for the rhizon samples in the non-cultivated samples. If we consider the DOM of rhizon to be of similar composition (FA/HA ratio) and similar reactivity than SC-DM DOM, the modeling of Cu speciation in the rhizon soil solution led to much

lower  $\text{Cu}^{2+}$  concentration than in the SC-DM soil solution (several orders of magnitude). Such differences in  $\text{Cu}^{2+}$  concentration did not seem plausible even if we did not measure  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in the rhizon. The explanation may then come from differences in DOM composition and/or reactivity. Fest et al.<sup>43</sup> observed that increasing solid/liquid ratio (from 100 to 500  $\text{g.L}^{-1}$ ) led to increasing DOC concentration during extraction with salt and water solutions. They also pointed out that increasing solid/liquid ratio was synonymous of decreasing the metal/DOC ratio in the soil solution. This means that the DOC extracted at higher solid/liquid ratio was less reactive than the one extracted at lower solid/liquid ratio. Rhizon samples were synonymous of higher solid/liquid ratio (around 5000  $\text{g.L}^{-1}$ ) compared to the SC-DM experiments (200  $\text{g.L}^{-1}$ ). The effects of solid/liquid ratio noticed by Fest et al.<sup>43</sup> might explain our differences between rhizon and SC-DM experiments.

### 4.3. Cu isotopic fractionation in soils and plants

To our knowledge, the present Cu isotopic compositions measured in soils are the first  $\delta^{65}\text{Cu}$  reported data in the literature. Concerning plants, these results are the first for Cu isotopic fractionation during plant cultivation on soils.

#### 4.3.1. Soil

$\delta^{65}\text{Cu}$  values for the three soils,  $-0.14 \pm 0.11$  ‰,  $-0.12 \pm 0.04$  ‰,  $-0.06 \pm 0.10$  ‰ for SMV1F, SMV1A and MUR2B, respectively (Table 5), were close to each other and to the NIST SRM976 standard. Main terrestrial material measured for Cu isotopic ratio at the present time also display isotopic composition close to 0 ‰. For magmatic rocks, basalts<sup>57-59</sup> have  $\delta^{65}\text{Cu}$  around 0 ‰ and granites<sup>60</sup> between  $-0.46$  ‰ and  $1.51$  ‰ with an average value of  $0.01 \pm 0.30$  ‰. Concerning sedimentary rocks, two Chinese loess samples have been measured by Li et al.<sup>60</sup> with  $\delta^{65}\text{Cu}$  of  $-0.02$  ‰ and  $0.03$  ‰. Sandstones and shale stones<sup>61</sup> present an average  $\delta^{65}\text{Cu}$  of  $0.09 \pm 0.24$  ‰ and sediment traps from the Atlantic ocean<sup>59</sup> of  $0.17 \pm 0.23$  ‰. Thus, Cu isotopic compositions of the three soils seem consistent with former literature data on terrestrial rocks. Measurements of Cu isotopic compositions of the bedrock of these soils and

of the added Bordeaux mixture would be of interest to better understand Cu isotopic compositions of these Cu-contaminated soils.

#### *4.3.2. Plants*

Cu isotopic fractionations observed in this study can be compared to our previous results on Cu isotopic fractionation in wheat during hydroponic experiments<sup>31</sup>. Cu uptake by roots led to an enrichment of heavier Cu isotope in the roots compared to the soil with a  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Roots-Soil}}$  of  $0.24 \pm 0.09 \text{ ‰}$  and  $0.23 \pm 0.28 \text{ ‰}$  for plants grown on SMV1F and SMV1A respectively. For plants cultivated on the calcareous soil MUR2B, a slight depletion of heavy isotope in the roots compared to soil was observed ( $-0.07 \pm 0.12 \text{ ‰}$ ). This is significantly different from the former observations during hydroponic experiments where roots were enriched in lighter isotope compared to the solution (from  $-0.40$  to  $-0.63 \text{ ‰}$ ). Nevertheless, it was close to what was observed for Zn in Jouvin et al.<sup>31</sup> and Weiss et al.<sup>62</sup> studies. For translocation, Cu isotopic fractionation during growth in soils was similar to what was observed in hydroponic experiment for wheat<sup>31</sup>: lighter Cu isotope was preferentially translocated ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoots-Roots}}$  from  $-0.33$  to  $-0.40 \text{ ‰}$ ).

#### *4.3.3. Interpreting isotopic fractionation*

Isotopic compositions in roots and, in general, in plants, are the results of many processes: adsorption on roots surfaces, diffusion, oxydo-reduction reactions, etc. The strategy of plant for metal uptake can also strongly influence the isotopic fractionation measured between plants and the nutrient environment<sup>63</sup>. Speciation in the solution is also of importance because it might influence the uptake strategy of plants<sup>64, 65</sup>. Isotopic compositions of organisms can also reflect the isotopic composition of free metals in solution<sup>65</sup> that are controlled by processes like adsorption on oxides, complexation with organic matter,...

In our study, plants cultivated on SMV1F and SMV1A soils displayed identical isotopic fractionation pattern for Cu uptake, between roots and soils, while plants grown on MUR2B soil behaved significantly differently. Wheat plants grown on SMV1A and SMV1F soils were

characterized by an enrichment of heavier Cu isotope in the roots compared to the soil while wheat plants cultivated on MUR2B soil showed a slight depletion of heavier isotope in the roots compared to soil.

At first sight, the main discrepancy in geochemical parameters between MUR2B and the two soils SMV1F and SMV1A is the pH. SMV1F and SMV1A display pH of 5.18 and 5.49 for planted rhizon samples, while MUR2B have much higher pH values of 7.52 for planted rhizon samples. This pH difference influenced the Cu speciation in the soils and in the soil solutions. Concerning soil solution measurements,  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in soil solutions was higher in SMV1A and SMV1F than in MUR2B (Figure 42), surely due to higher pH for MUR2B. Modeled Cu speciation is also different for the soils. Cu in SMV1A and SMV1F was only complexed to SOM, other phases were below 5 %, while, for MUR2B, adsorption on oxides contributed to 11.3 % of Cu speciation (Figure 45). Moreover, repartition of Cu in the SOM was different for the different soils. For low pH SMV1A and SMV1F soils, Cu was mainly complexed to LAS, while, for high pH MUR2B, HAS chiefly complexed Cu (Figure 45). In the soil solution, all three soils presented the same speciation and identical Cu repartition on DOM (Appendix 3).

All these differences between the three soils might affect the metal plant uptake. However how these processes and differences will modify their associated isotopic fractionation is still a subject of interrogations. Variations in Cu speciation in the soil are likely to induce discrepancies in isotopic fractionation. Previous work of Pokrovsky et al.<sup>3</sup> showed that Cu adsorption on oxides produced an enrichment of heavy isotope of adsorbed Cu and a depletion of heavy isotope in the solution. Based on work with Zn isotopes<sup>4</sup>, it is also probable that Cu complexation with HAS of organic matter (OM) will also yield an enrichment of heavy Cu isotope onto OM and an enrichment of light isotopes in the solution. Complexation of Cu with LAS should not induce any Cu isotopic fractionation.

Hence, with more Cu adsorption on oxides and with Cu complexed to SOM mainly on high affinity sites, soil solution Cu of MUR2B soil is likely to be more enriched in lighter Cu isotopes compared to soil solutions of SMV1A and SMV1F soils. Thus, the discrepancy observed in Cu isotopic compositions on roots between MUR2B and SMV1A and SMV1F can at least partially be explained by Cu speciation in the soils. Further experiments and

isotopic measurements to fully understand Cu isotopic compositions measured in plants and Cu uptake processes.

## **5. Conclusion**

This work at the convergence of soil geochemistry and vegetal biology confirmed the importance of speciation for the knowledge of Cu bioavailability for plants. In soils with similar total and EDTA-extractable Cu concentrations, a correlation was observed between pH and Cu concentrations in wheat plants and a negative one between  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations in soil solutions and Cu concentrations in plants. This anti-correlation might be explained by competing effects between protons and other cations at low pH or by the development of specific uptake by plants. More work is needed to identify the mechanisms of Cu uptake by plants and which Cu species in the soil solution will contribute to the Cu flux to the plant.

Good insights of the soil solution have been provided via SC-DM experiment and rhizon sampling. However, following the study of Fest et al.<sup>43</sup>, other experimental work has to be realized about i) the nature of DOM extracted by the different devices with different soil/solution ratio and ii) the influence of the extracting solutions for the determination of DOM.

Finally, isotopic fractionation in the wheat plants is inferred to be dependant on Cu speciation in the soil, with soil solution enriched in light Cu isotope at neutral pH compared to acidic pH. This has to be confirmed by direct measurement of Cu isotopic composition in the soil solutions and by experimentally testing the effect of OM on Cu isotopic fractionation.

### Literature Cited

1. Michaud A. M.; Bravin M. N.; Galleguillos M.; Hinsinger P., Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant and Soil* **2007**, 298, 99-111.
2. Cancès B.; Ponthieu M.; Castrec-Rouelle M.; Aubry E.; Benedetti M. F., Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* **2003**, 113, 341-355.
3. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Emnova E. E.; Kompantseva E. I.; Freydier R., Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hyd)oxides: Possible structural control. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 1742-1757.
4. Jouvin D.; Louvat P.; Maréchal C. N.; Juillot F.; Benedetti M. F., Zn isotopic fractionation: why organic matters. *Environmental Science and Technology* **2009**, *In revision*.
5. Novoa-Munoz J.; Queijeiro J. M. G.; Blanco-Ward D.; Alvarez-Olleros C.; Martinez-Cortizas A.; Garcia-Rodeja E., Total copper content and its distributions in acid-vineyard soils developed from granitic rocks. *The Science of the Total Environment* **2007**, 378, 23-27.
6. Fernandez-Calvino D.; Pateiro-Moure M.; Lopez-Periago E.; Arias-Estevez M.; Novoa-Munoz J. C., Copper distribution and acide-base mobilization in vineyard soils and sediments from Galicia (NW Spain). *European Journal of Soil Science* **2008**, 59, 315-326.
7. Fernandez-Calvino D.; Rodriguez-Suarez J. A.; Lopez-Periago E.; Arias-Estevez M.; Simal-Gandara J., Copper contents of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distributions among soil or sediment components. *Geoderma* **2008**, 145, 91-97.
8. Besnard E.; Chenu C.; Robert M., Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution* **2001**, 112, 329-337.
9. Brun L. A.; Maillet J.; Hinsinger P.; Pépin M., Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* **2001**, 111, 293-302.
10. Chaignon V.; Di Malta D.; Hinsinger P., Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist* **2002**, 154, 121-130.
11. Novoa-Munoz J.; Queijeiro J. M. G.; Blanco-Ward D.; Alvarez-Olleros C.; Martinez-Cortizas A.; Garcia-Rodeja E., Total copper content and its distributions in acid-vineyard soils developed from granitic rocks. *Science of the Total Environment* **2007**, 378, 23-27.
12. Flogéac K.; Guillon E.; Aplin-court M., Surface complexation of copper(II) on soil particles: EPR and XAFS studies. *Environmental Science and Technology* **2004**, 38, 3098-3103.

13. Karlsson T.; Persson P.; Skyllberg U., Complexation of copper(II) in organic soils and in dissolved organic matter - EXAFS evidence for chelate ring structures. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*, 2623-2628.
14. Strawn D. G.; Baker L. L., Speciation of Cu in a contaminated agricultural soil measured by XAFS,  $\mu$ -XAFS, and  $\mu$ -XRF. *Environmental Science and Technology* **2008**, *42*, 37-42.
15. McBride M., Forms and distribution of copper in solid and solution phase of soil. In *Copper in soils and plants*, Lorenagan J. F.; Robson A. D.; Graham R. D., Eds. Academic Press: 1981; pp 25-45.
16. Vulkan R.; Zhao F.; Barbosa-Jefferson V.; Preston S.; Paton G. I.; Tipping E.; McGrath S. P., Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environmental Science and Technology* **2000**, *34*, 5115-5121.
17. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Lofts S.; Tipping E.; Van Riemsdijk W. H., Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. *Environmental Science and Technology* **2002**, *36*, 4804-4810.
18. Benedetti M. F.; Van Riemsdijk W. H.; Koopal L. K.; Kinniburgh D. G.; Goody D. C.; Milne C. J., Metal binding by natural organic matter: from the model to the field. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **1996b**, *60*, 2503-2513.
19. Degryse F.; Smolders E.; Parker D. R., Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant and Soil* **2006**, *289*, 171-185.
20. Marschner H.; Römheld V., Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* **1994**, *165*, 261-274.
21. Michaud A. M.; Chappellaz C.; Hinsinger P., Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant and Soil* **2008**, *310*, 151-165.
22. Von Wirén N.; Marschner H.; Römheld V., Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc. *Plant Physiology* **1996**, *111*, 1119-1125.
23. Thakali S.; Allen H. E.; Di Toro D. M.; Ponizovsky A. A.; Rooney C. P.; Zhao F.-J.; McGrath S. P., A terrestrial biotic ligand model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to Barley root elongation in soils. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*, 7085-7093.
24. Weiss D. J.; Rausch N.; Mason F. D.; Coles B. J.; Wilkinson J. J.; Ukonmaanaho L.; Arnold T.; Nieminen T. M., Atmospheric deposition and isotope biogeochemistry of zinc in ombrotrophic peat. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2007**, *71*, 3498-3517.
25. Dolgoplova A.; Weiss D. J.; Seltnann R.; Kober B.; Mason T. F. D.; Coles B.; Stanley C. J., Use of isotope ratios to assess sources of Pb and Zn dispersed in the

environment during mining and ore processing within the Orlovka-Spokoinoe mining site (Russia). *Applied Geochemistry* **2006**, 21, 563-579.

26. Sivry Y.; Riotte J.; Sonke J. E.; Audry S.; Schäfer J.; Viers J.; Blanc G.; Freydier R.; Dupré B., Zn isotopes as tracers of anthropogenic pollution from Zn-ore smelters : The Riou Mort-Lot River system. *Chemical Geology* **2008**, 255, 295-304.

27. Cloquet C.; Carignan J.; Libourel G., Isotopic composition of Zn and Pb atmospheric depositions in an urban/periurban area of northeastern France. *Environmental Science and Technology* **2006**, 40, 6594-6600.

28. Juillot F.; Maréchal C.; Ponthieu M.; Cacaly S.; Morin G.; Benedetti M.; Hazemann J.L.; Proux O.; Guyot F., Zn isotopic fractionation caused by sorption on goethite and 2-Lines ferrihydrite. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, 72, 4886-4900.

29. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Freydier R., Zinc stable isotope fractionation during its adsorption on oxides and hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 291, 192-200.

30. Ehrlich S.; Butler I.; Halicz L.; Rickard D.; Oldroyd A.; Matthews A., Experimental study of the copper isotope fractionation between aqueous Cu(II) and covellite, CuS. *Chemical Geology* **2004**, 209, 259-269.

31. Jouvin D.; Ferec F.; Louvat P.; Bravin M. N.; Hinsinger P.; Benedetti M. F., Cu and Zn isotopic fractionation by tomato and wheat plants. *In prep for Plant and Soil* **2009**.

32. Maréchal C. N.; Télouk P.; Albarède F., Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* **1999**, 156, 251-273.

33. Chen J.; Louvat P.; Gaillardet J.; Birck J-L., Direct separation of Zn from dilute aqueous solutions for isotope composition determination using multi-collector ICP-MS. *Chemical Geology* **2008**, *In press*.

34. Temminghoff E. J. M.; Plette A. C. C.; Van Eck R.; Van Riemsdijk W. H., Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan Membrane Technique. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 417, 149-157.

35. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Van Riemsdijk W. H., Determination of the free ion concentration of trace metals in soil solution using a soil column Donnan membrane technique. *European Journal of Soil Science* **2001**, 52, 629-637.

36. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Tipping E., Generic NICA-Donnan parameters for proton binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* **2001**, 35, 2049-2059.

37. Milne C. J.; Kinniburgh D. G.; Van Riemsdijk W. H.; Tipping E., Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* **2003**, 37, 958-971.



38. Ponthieu M.; Juillot F.; Hiemstra T.; van Riemsdijk W. H.; Benedetti M. F., Metal ion binding to iron oxides. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, *70*, 2679-2698.
39. Tonkin J. W.; Balistrieri L. S.; Murray J. W., Modeling sorption of divalent metal cations on hydrous manganese oxide using the diffuse double layer. *Applied Geochemistry* **2004**, *19*, 29-53.
40. Weng L.; Temminghoff E. J. M.; Van Riemsdijk W. H., Contribution of individual sorbents to the control of heavy metal activity in sandy soil. *Environmental Science and Technology* **2001**, *35*, 4436-4443.
41. Morel F. M. M.; Hering J. G., *Principles and applications of aquatic chemistry (2nd ed.)*. John Wiley New York, 1993.
42. Lofts S.; Tipping E., Solid-solution metal partitioning in the Humber rivers: application of WHAM and SCAMP. *The Science of the Total Environment* **2000**, *251/252*, 381-389.
43. Fest E. P. M. J.; Temminghoff E. J. M.; Comans R. N. J.; van Riemsdijk W. H., Partitioning of organic matter and heavy metals in a sandy soil: Effects of extracting solution, solid to liquid ratio and pH. *Geoderma* **2008**, *146*, 66-74.
44. Kochian L. V.; Pineros M. A.; Hoekenga O. A., The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. *Plant and Soil* **2005**, *274*, 175-195.
45. Kinraide T. B.; Ryan P. R.; Kochian L. V., Interactive effects of  $Al^{3+}$ ,  $H^{+}$ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiology* **1992**, *99*, 1461-1468.
46. Chaignon V.; Bedin F.; Hinsinger P., Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant and Soil* **2002**, *243*, 219-228.
47. Chaignon V.; Sanchez-Neira I.; Herrmann P.; Jaillard B.; Hinsinger P., Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* **2003**, *123*, 229-238.
48. Brun L. A.; Maillet J.; Richarte J.; Herrmann P.; Remy J. C., Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* **1998**, *102*, 151-161.
49. Cornu J.-Y.; Staunton S.; Hinsinger P., Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant and Soil* **2007**, *292*, 63-77.
50. Bravin M. N.; Le Merrer B.; Denaix L.; Schneider A.; Hinsinger P., Copper uptake kinetic in hydroponically-grown durum wheat as compared with soil's ability to supply Cu. *In prep for Plant and Soil*.

51. Schröder T. J.; Hiemstra T.; Vink J. P. M.; van der Zee S. E. A. T. M., Modeling of the solid-solution partitioning of heavy metals and arsenic in embanked flood plain soils of the rivers Rhine and Meuse. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39*, 7176-7184.
52. Tipping E.; Berggren D.; Mulder J.; Woof C., Modelling the solid-solution distributions of protons, aluminium, base cations and humic substances in acid soils. *European Journal of Soil Science* **1995**, *46*, 77-94.
53. Tipping E.; Rieuwerts J.; Pan G.; Ashmore M. R.; Lofts S.; Hill M. T. R.; Farago M. E.; Thornton I., The solid-solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) in upland soils of England and Wales. *Environmental Pollution* **2003**, *125*, 213-225.
54. Tye A. M.; Young S.; Crout N. M. J.; Zhang H.; Preston S.; Zhao F. J.; McGrath S. P., Speciation and solubility of Cu, Ni and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science* **2004**, *55*, 579-590.
55. Bryan S. E.; Tipping E.; Hamilton-Taylor J., Comparison of measured and modelled copper binding by natural organic matter in freshwaters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **2002**, *133*, 37-49.
56. Guthrie J. W.; Hassan N. M.; Salam M. S. A.; Fasfous I. I.; Murimboh C. A.; Murimboh J.; Chakrabarti C. L.; Grégoire D. C., Complexation of Ni, Cu, Zn, and Cd by DOC in some metal-impacted freshwater lakes: a comparison of approaches using electrochemical determination of free-metal-ion and labile complexes and a computer speciation model, WHAM V and VI. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *528*, 205-218.
57. Archer C.; Vance D., Mass discrimination correction in multiple-collector plasma source mass spectrometry: an example using Cu and Zn isotopes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 656-665.
58. Ben Othman D.; Luck J. M.; Bodinier J. L.; Arndt N. T.; Albarède F., Cu-Zn isotopic variations in the Earth's mantle. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2006**, *70*, A46.
59. Maréchal C. N. Géochimie des isotopes du cuivre et du zinc : méthode, variabilité naturelle et application océanographique. Université Joseph Fournier - Grenoble 1, Grenoble, 1998.
60. Li W.; Jackson S. E.; Pearson N. J.; Alard O.; Chappell B. W., The Cu isotopic signature of granites from the Lachlan Fold Belt, SE Australia. *Chemical Geology* **2009**, *258*, 38-49.
61. Asael D.; Matthews A.; Bar-Matthews M.; Halicz L., Copper isotope fractionation in sedimentary copper mineralization (Timna Valley, Israel). *Chemical Geology* **2007**, *243*, 238-254.
62. Weiss D. J.; Mason T. F. D.; Zhao F. J.; Kirk G. J. D.; Coles B. J.; Horstwood M. S. A., Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytologist* **2005**, *165*, 703-710.
63. Guelke M.; Von Blanckenburg F., Fractionation of stable iron isotopes in higher plants. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 1896-1901.

64. Wang P.; Zhou D. M.; Luo X. S.; Li L. Z., Effects of Zn-complexes on zinc uptake by wheat (*Triticum aestivum*) roots: a comprehensive consideration of physical, chemical and biological processes on biouptake. *Plant and Soil* **2009**, *316*, 177-192.
65. John S. G.; Geis R. W.; Saito M. A.; Boyle E. A., Zinc isotope fractionation during high-affinity and low-affinity zinc transport by the marine diatom *Thalassiosira oceanica*. *Limnology and Oceanography* **2007**, *52*, 2710-2714.

**Appendix 2:** Isotopic measurements in three soils (SMV1F, SMV1A and FRX3B) and roots and shoots of plants cultivated on these soils.

			$\delta^{65}\text{Cu}$		n		$\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Roots-Soil}}$	$\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Shoots-Roots}}$
			‰	2σ	purification measurements			
SMV1F	Soil		-0.14	0.11	2	4	0.20	-0.34
	Pot 1	Roots	0.06	0.12	1	1		
		Shoots	-0.28	0.12	1	1	0.00	-0.20
	Pot 2	Roots	-0.14	0.18	2	2		
		Shoots	-0.34	0.12	1	1	0.29	-0.41
	Pot 3	Roots	0.15	0.12	1	1		
		Shoots	-0.26	0.12	1	1	0.35	-0.64
	Pot 4	Roots	0.20	0.12	1	1		
		Shoots	-0.44	0.12	1	1	0.32	-0.46
	Pot 5	Roots	0.18	0.12	6	2		
	Shoots	-0.28	0.12	1	1			
SMV1A	Soil		-0.12	0.04	2	4	0.18	-0.29
	Pot 1	Roots	0.05	0.04	2	4		
		Shoots	-0.24	0.12	1	2	0.31	-0.47
	Pot 2	Roots	0.18	0.12	1	3		
		Shoots	-0.29	0.12	1	2	0.25	-0.48
	Pot 3	Roots	0.12	0.11	2	4		
		Shoots	-0.35	0.16	2	5	0.24	-0.43
	Pot 4	Roots	0.12	0.10	2	4		
		Shoots	-0.32	0.12	1	1	0.25	-0.29
	Pot 5	Roots	0.12	0.13	1	3		
	Shoots	-0.17	0.12	1	1			
MUR 2B	Soil		-0.06	0.10	2	4	-0.11	-0.23
	Pot 1	Roots	-0.17	0.12	1	1		
		Shoots	-0.40	0.12	1	1	0.01	-0.58
	Pot 2	Roots	-0.05	0.12	1	1		
		Shoots	-0.63	0.12	1	1	-0.07	-0.32
	Pot 3	Roots	-0.14	0.01	2	2		
		Shoots	-0.45	0.12	1	1	-0.12	-0.20
	Pot 4	Roots	-0.18	0.12	1	1		
		Shoots	-0.38	0.12	1	1		
	Pot 5	Roots						
	Shoots	-0.10	0.12	1	1			

SC-DM	Total SOIL					SOIL SOLUTION			
	SOM (as HA) reactivity (%)	Cu-SOM %	Cu-Oxides %	Cu-Clays %	Cu-solution %	DOM (as FA) reactivity (%)	Cu-DOM %	Cu <sup>2+</sup> %	Cu-Inorganic %
FXR3B	39.8	95.1	1.0	3.25	0.7	69.1	18.2	81.1	0.8
SMV1F	22.1	95.8	3.5	0.05	0.7	63.9	97.9	2.1	0.1
SMV1A	31.1	97.1	2.5	0.03	0.4	45.3	98.9	1.1	0.0
JC1A	46.2	93.2	6.6	0.02	0.2	36.2	98.4	1.4	0.1
MUR2B	36.4	88.3	11.3	0.00	0.4	42.0	99.2	0.5	0.3
RG 2 A	28.7	77.0	22.8	0.01	0.2	79.8	98.0	1.0	1.0

	Cu SOM speciation		Cu DOM speciation	
	% LAS	% HAS	% LAS	% HAS
FXR3B	93.2	6.8	99.7	0.3
SMV1F	70.4	29.6	98.9	1.1
SMV1A	66.5	33.5	98.3	1.7
JC1A	54.6	45.4	97.5	2.5
MUR2B	28.3	71.7	96.1	3.9
RG 2 A	24.8	75.2	93.4	6.6

**Appendix 3:** Cu speciation modeled in the soil and in the soil solution, through the ECOSAT code, along with SOM and DOM reactivity and Cu speciation in the OM (LAS = Low Affinity Sites and HAS = High Affinity Sites).



# Conclusion





## Conclusion

Les cycles biogéochimiques des métaux traces, comme le cuivre et le zinc, sont très fortement perturbés par les activités anthropiques : extraction de minerais et industries métallurgiques, combustion d'énergies fossiles, épandages de boues industrielles, de pesticides, d'engrais,... Ces apports sont susceptibles d'induire de profonds changements dans les écosystèmes concernés, de modifier la spéciation des métaux, leur mobilité et leur biodisponibilité. La compréhension des cycles biogéochimiques est indispensable pour l'évaluation des risques liés à ces apports anthropiques. Ceci passe par l'étude des différents processus, chimiques, physiques et biologiques, qui vont influencer la spéciation du cuivre et du zinc et du coup, leur prélèvement par les organismes vivants.

Dans ce contexte, les mesures de compositions isotopiques dans l'environnement nous permettent de mieux contraindre les sources de pollution et les mécanismes affectant les métaux dans l'environnement. Pour cela, il est nécessaire de bien caractériser les compositions isotopiques des différentes sources de zinc, naturelle et anthropique mais aussi le fractionnement isotopique associé aux processus modifiant la spéciation des métaux. Les objectifs de cette thèse étaient de s'intéresser à l'interaction du cuivre et du zinc avec différents objets du compartiment organique et de voir dans quelle mesure les fractionnements isotopiques du cuivre et du zinc peuvent nous éclairer sur ces processus.

Tout d'abord, un premier processus, la complexation du zinc avec un acide humique, analogue de la matière organique naturelle, a été étudié en laboratoire en fonction du pH. Cela a été réalisé à l'aide d'un dispositif expérimental, la technique de la Membrane de Donnan (DM), permettant de séparer le zinc libre du zinc complexé à l'acide humique. **Ce dispositif a été validé pour les mesures isotopiques et permettra à terme la mesure de compositions isotopiques i) de systèmes aquatiques (rivières, lacs,...) in-situ, ii) de solutions de sols reconstituées grâce à l'ajout d'une colonne de sol<sup>1</sup> et iii) des coefficients de fractionnement isotopique mesurés entre d'autres métaux et d'autres ligands.**

A pH inférieur à 6, le zinc libre  $\text{Zn}^{2+}$  est l'espèce majoritaire en solution et la complexation du zinc avec l'acide humique ne peut être associée à aucun fractionnement isotopique. Avec l'augmentation du pH, le zinc complexé devient majoritaire et un enrichissement significatif en isotopes lourds du zinc complexé à l'acide humique a pu être observé au delà de pH 6,  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{AcideHumique-Solution}} = +0,24 \text{ ‰} \pm 0,06 (2\sigma)$ . Pour aller plus loin dans notre compréhension du fractionnement avec la matière organique, nous avons modélisé la spéciation du zinc dans notre système expérimental. Dans le modèle NICA-Donnan utilisé pour décrire le comportement des substances humiques, la complexation d'un élément est décrit à l'aide de deux types de sites : des sites de basse affinité de type carboxylique et des sites de haute affinité de type phénolique. Aux pH acides, le zinc sera principalement complexé aux sites de basse affinité alors qu'à l'inverse à pH neutre, il sera plutôt lié aux sites de haute affinité. Le fractionnement isotopique observé résulte donc de la hausse du taux de complexation du zinc sur l'acide humique avec le pH et d'un changement de proportions de complexation sur les deux types de site. L'enrichissement du zinc en isotopes lourds sur l'acide humique peut être associé à des constantes de complexation plus élevées et des longueurs de liaisons zinc-acide humique plus courtes par rapport au zinc en solution. Par bilan de masse, nous avons déterminé les coefficients de fractionnement de 1,0004 pour les sites de haute affinité et de 1,0000 pour les sites de basse affinité.

Ces différences de comportement pour les deux types de sites joueront un rôle important pour définir le fractionnement isotopique d'une matière organique donnée. Par exemple, à partir de mesures de  $\delta^{66}\text{Zn}$  réalisées sur la Seine par Chen et al.<sup>2</sup>, la composition isotopique du zinc libre  $\text{Zn}^{2+}$  a été modélisée avec différentes proportions de sites de haute et basse affinité pour la matière organique dissoute. Le fractionnement isotopique,  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{TotalDissous-Zn}^{2+\text{libre}}}$ , est variable et non négligeable (entre +0,02 ‰ et +0,18 ‰), selon la proportion de sites de haute et basse affinité considérée dans la matière organique dissoute.

Ces premiers résultats concernant le fractionnement isotopique d'un métal avec un acide humique sont de première importance. En effet, les substances humiques, dont font partie les acides humiques, sont des complexants majeurs des métaux dans l'environnement et sont susceptibles de modifier leur spéciation et leur mobilité dans

l'environnement. Cette première étude implique que:

- la composition isotopique dans un sol sera différente entre solide et solution, si la phase solide contient de la matière organique. Cet effet s'ajoute au fractionnement isotopique dû à l'adsorption sur des oxydes comme montré, par exemple, par Pokrovsky et al.<sup>3,4</sup>, Juillot et al.<sup>5</sup> et Balistrieri et al.<sup>5</sup>.
- à l'intérieur même d'une phase dissoute, un métal pourra présenter plusieurs compositions isotopiques, celle du métal libre pouvant être différente de celle du métal complexé à des substances humiques dissoutes.
- le fractionnement isotopique sera plus important pour les substances humiques contenant plus de sites de haute affinité, comme les acides humiques.
- les organismes vivants auront accès à différents «pools» isotopiques en fonction de l'espèce chimique qu'ils prélèveront.

**L'étude d'autres types de matière organique, comme les acides fulviques, nous permettrait de confirmer et de mieux contraindre le fractionnement isotopique mesuré sur chaque type de sites. Via notre dispositif expérimental (la Membrane de Donnan), la complexation de la matière organique avec d'autres éléments chimiques, comme le cuivre, le magnésium, peut être quantifié isotopiquement.**

La deuxième partie de cette thèse fût consacrée au fractionnement isotopique du cuivre et du zinc lors de leur prélèvement par les plantes. Des études avaient déjà précédemment été réalisées sur le zinc<sup>6, 7</sup> (et sur le cuivre mais l'étude n'a pas été publiée), mais cela nous a permis i) de comparer et éventuellement confirmer nos résultats à ceux obtenus précédemment dans des conditions expérimentales proches<sup>6</sup> et ii) de comparer le comportement du cuivre et du zinc en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales.

Le prélèvement du cuivre et du zinc par les plantes reste encore mal connu. Il est probable que certaines voies de prélèvement soient communes avec celles du fer, comme par exemple la famille de protéines ZIP<sup>8</sup> ou des complexants comme les phytosidérophores<sup>9, 10</sup>. Des plants de tomate et de blé, présentant deux stratégies différentes de prélèvement du fer, ont été cultivés en hydroponie avec deux concentrations en fer différentes dans les solutions nutritives.

Le cuivre et le zinc présente des comportements différents. Les mesures de concentrations du cuivre et du zinc montrent que dans nos conditions expérimentales, la concentration en zinc dans les deux plantes (blé et tomate) augmente dans une solution appauvrie en fer alors que la concentration en cuivre ne change pas. Concernant les rapports isotopiques, dans le cas du zinc, les racines des deux plantes sont enrichies en isotopes lourds par rapport à la solution nutritive ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Racines-SolutionNutritive}}$  entre -0.02 et 0,16 ‰) et appauvries en isotopes lourds dans les parties aériennes par rapport aux racines ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{PartiesAériennes-Racines}}$  entre -0,51 et -0,25 ‰). Ces résultats en zinc sont similaires à ceux obtenus par Weiss et al.<sup>6</sup> en hydroponie et confirment l'influence des organismes vivants sur les fractionnements isotopiques dans l'environnement.

Les résultats obtenus pour le cuivre sont clairement différents pour les racines des deux plantes avec un enrichissement en isotopes légers par rapport à la solution avec un  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Racines-SolutionNutritive}}$  entre -0,84 et -0,11 ‰. En revanche, dans les parties aériennes, le fractionnement isotopique mesuré est comparable à celui du zinc avec un  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{PartiesAériennes-Racines}}$  entre -0,41 et -0,16 ‰. Différents processus sont candidats pour expliquer cette différence entre cuivre et zinc pour le prélèvement par les racines : l'adsorption sur les parois racinaires, le passage de membranes par le biais de transporteurs, spécifiques ou non-spécifiques, des phénomènes d'oxydo-réduction ou de diffusion... Si les mécanismes de prélèvements du cuivre et du zinc par le blé et la tomate n'ont pas pu être clairement identifiés, les mesures isotopiques ont néanmoins permis de bâtir des hypothèses :

- i) d'après le code Fluxy décrivant le prélèvement d'éléments chimiques par des interfaces biologiques avec des mécanismes de type Michaelis-Menten, les espèces chimiques prélevées par les plantes sont différentes pour le cuivre et pour le zinc,
- ii) des processus de réduction favorisant les isotopes légers<sup>11</sup>, associés à des transporteurs COPT1, sont susceptibles de se produire dans le cas du cuivre
- iii) la concentration en ions libres dans la solution est plus faible pour le cuivre que pour le zinc, entraînant probablement des mécanismes de prélèvement différents pour le cuivre et le zinc.

La similitude du fractionnement entre cuivre et zinc lors de la translocation peut s'expliquer par des transporteurs internes identiques, à priori la nicotianamine, pour acheminer le cuivre et le zinc vers les parties aériennes<sup>12, 13</sup>.

Cette étude montre donc l'importance des végétaux terrestres comme sources de fractionnement isotopique dans l'environnement. Cependant, ce fractionnement semble influencé par la spéciation en solution et par les mécanismes de prélèvement des plantes en fonction de leur milieu de vie. Il semblerait donc difficile à prévoir.

**Les plantes sont des organismes complexes, dont les mécanismes de prélèvement des métaux sont encore mal compris. Ainsi, des mesures isotopiques du cuivre complexé avec des complexants comme les phytosidérophores nous permettrait une meilleure interprétation de ces premiers résultats sur le blé et la tomate. Des expériences avec des solutions nutritives à différentes concentrations en cuivre pourraient aussi nous aider à clarifier le fractionnement dû au prélèvement du cuivre via des transporteurs spécifiques ou non. De plus, d'autres expériences avec différentes spéciations en solution du cuivre et du zinc ou avec des ligands présentant différentes constantes de labilité nous donnerait une quantification de leur influence lors de mesures isotopiques d'organismes vivants. Ensuite, des expériences sur de plus grandes échelles de temps, jusqu'à la formation des fruits ou graines, ou des mesures sur des plantes pérennes nous permettrait de reproduire des processus plus proches de ceux ayant lieu dans l'environnement.**

Pour finir, dans le cadre de projets PNETOX et ECCO du CNRS, je me suis intéressée à la biodisponibilité, à la spéciation et au fractionnement isotopique du cuivre dans d'anciens sols viticoles. Les sols viticoles sont en effet caractérisés par des épandages réguliers de bouillie bordelaise ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) pour lutter contre le mildiou, une maladie parasitaire des plantes ; ce qui amène à un enrichissement massif en cuivre des horizons superficiels du sol. Six sols, provenant du Languedoc, ont été sélectionnés parmi 46 sols étudiés dans le cadre du projet PNETOX. Ces sols ont des concentrations en cuivre total similaires (entre 100 et 157  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) mais des pHs variables (entre 4,23 et 7,48), et l'objectif de l'étude était d'estimer l'influence du pH sur la spéciation du cuivre. Celle-ci a été évaluée à l'aide de mesures rhizon, de colonnes de sol avec le dispositif de la Donnan Membrane (SC-DM) et de la modélisation. Des plants de blé

dur ont été cultivés sous serre sur ces sols pour appréhender la biodisponibilité du cuivre dans ces sols. De plus, des mesures de compositions isotopiques du cuivre ont été réalisées sur ces plantes et sur les sols contaminés.

Le cuivre extrait par l'EDTA représente entre 38 et 46 % du cuivre total du sol. Les mesures de concentrations de cuivre de la solution du sol par rhizon et par SC-DM sont en bon accord, aussi bien pour les sols plantés que pour les sols de contrôle. La concentration en cuivre libre  $\text{Cu}^{2+}$  dans la solution du sol diminue avec le pH. Dans le sol comme dans la solution du sol, la spéciation du cuivre est principalement contrôlée par la matière organique, du sol (SOM) ou de la solution du sol (DOM). Probablement parce que les sols choisis présentent des concentrations similaires en cuivre, la concentration en cuivre dans les plantes (racines et parties aériennes) n'est pas corrélée avec la teneur en cuivre du sol, aussi bien total que celui extrait à l'EDTA. Cependant, une corrélation significative et positive a été observée entre la concentration en cuivre dans les plantes et le pH des solutions de sol, ainsi qu'une corrélation négative entre la concentration en cuivre dans les plantes et le cuivre libre  $\text{Cu}^{2+}$  dans la solution de sol. Ce résultat contredit les modèles couramment utilisés, comme le FIAM et le BLM, qui considèrent les ions libres  $\text{Cu}^{2+}$  comme les principaux contributeurs au flux vers la plante et donc associent pH calcaires et déficiences en cuivre. Nos observations peuvent s'expliquer par i) l'exudation, par le blé, aux pHs calcaires d'agents complexants du fer (phytosidérophores) capables de complexer aussi le cuivre ou ii) la baisse de la concentration en protons, qui entraîne une baisse de la compétition pour les sites de complexation à la surface des racines.

A l'heure actuelle, il n'existe pas, dans la littérature, de données sur la composition isotopique du cuivre dans des sols. Celles que nous présentons dans ce travail sont donc les premières. Le  $\delta^{65}\text{Cu}$  mesuré dans les sols est proche du standard NIST SRM976 avec des valeurs entre -0,06 et -0,14 ‰. Les racines des plants de blé cultivé sur deux sols acides (pH 5,4) sont enrichies en isotope lourd par rapport aux sols ( $\Delta^{65}\text{Cu}$  moyen de 0,24 ‰) tandis que les parties aériennes sont enrichies en isotope léger par rapports aux racines ( $\Delta^{65}\text{Cu}$  moyen de -0,40 ‰). Les racines des plants de blé cultivé sur un sol calcaire (pH 6,2) présentent un  $\delta^{65}\text{Cu}$  de 0,07 ‰ plus léger que celui du sol tandis que les parties aériennes ont un comportement similaire à celles des sols acides avec un enrichissement en isotope léger de -0,33 ‰ ( $\Delta^{65}\text{Cu}$ ) par rapport aux racines. Cette

différence au niveau des racines peut s'expliquer par des différences de spéciation du cuivre dans le sol. Aux pH acides, le cuivre est principalement complexé aux sites de basse affinité de la matière organique des sols alors qu'aux pH calcaires, le cuivre est complexé sur les sites de haute affinité de la matière organique des sols et il est aussi adsorbé sur les oxydes de fer et de manganèse. Ces deux derniers types de complexation sont synonymes de fractionnement isotopiques plus importants que lors de la complexation sur des sites de basse affinité de la matière organique (Chapitre III)<sup>3, 14</sup>.

**Cette étude, à la suite de celle sur la culture de plantes en hydroponie (Chapitre IV), semble appuyer l'importance, pour l'absorption par les plantes, de la spéciation des métaux dans la solution ou dans le sol en contact avec ces plantes. Il est bien entendu nécessaire de confirmer ces premiers résultats sur d'autres sols ou en conditions contrôlées, par exemple en menant également une étude sur des sols à teneurs variables en métaux ou en matière organique mais à pH constant. Ce travail implique, de plus, qu'il est indispensable dans les prochaines études de mesures isotopiques dans l'environnement de déterminer au mieux la spéciation des métaux mesurés.**

### Literature Cited

1. Cancès B.; Ponthieu M.; Castrec-Rouelle M.; Aubry E.; Benedetti M. F., Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* **2003**, *113*, 341-355.
2. Chen J.; Gaillardet J.; Louvat P., Zinc isotopes in the Seine river waters: A probe of anthropogenic contamination. *Environmental Science and Technology* **2008**, *42*, 6494-6501.
3. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Emnova E. E.; Kompantseva E. I.; Freydier R., Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hyd)oxides: Possible structural control. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *72*, 1742-1757.
4. Pokrovsky O. S.; Viers J.; Freydier R., Zinc stable isotope fractionation during its adsorption on oxides and hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *291*, 192-200.
5. Juillot F.; Maréchal C.; Ponthieu M.; Cacaly S.; Morin G.; Benedetti M.; Hazemann J.L.; Proux O.; Guyot F., Zn isotopic fractionation caused by sorption on goethite and 2-Lines ferrihydrite. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **2008**, *72*, 4886-4900.
6. Weiss D. J.; Mason T. F. D.; Zhao F. J.; Kirk G. J. D.; Coles B. J.; Horstwood M. S. A., Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytologist* **2005**, *165*, 703-710.
7. Viers J.; Oliva P.; Nonell A.; Gélabert A.; Sonke J. E.; Freydier R.; Gainville R.; Dupré B., Evidence of Zn isotopic fractionation in a soil-plant system of a pristine tropical watershed (Nsimi, Cameroon). *Chemical Geology* **2007**, *239*, 124-137.
8. Guerinot M. L., The ZIP family of metal transporters. *Biochimica and Biophysica Acta* **2000**, *1465*, 190-198.
9. Von Wirén N.; Marschner H.; Römheld V., Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc. *Plant Physiology* **1996**, *111*, 1119-1125.
10. Michaud A. M.; Chappellaz C.; Hinsinger P., Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant and Soil* **2008**, *310*, 151-165.
11. Ehrlich S.; Butler I.; Halicz L.; Rickard D.; Oldroyd A.; Matthews A., Experimental study of the copper isotope fractionation between aqueous Cu(II) and covellite, CuS. *Chemical Geology* **2004**, *209*, 259-269.



12. Von Wirén N.; Klair S.; Bansal S.; Briat J-F.; Khodr H.; Shiori T.; Leigh R. A.; Hider R. C., Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* **1999**, *119*, 1107-1114.
13. Pich A.; Scholz G., Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-simulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany* **1996**, *47* (294), 41-47.
14. Jouvin D.; Louvat P.; Maréchal C. N.; Juillot F.; Benedetti M. F., Zn isotopic fractionation: why organic matters. *Environmental Science and Technology* **2009**, *In revision*.